



UNIVERSITÀ
degli STUDI
di CATANIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOLOGICHE, GEOLOGICHE E AMBIENTALI

Dottorato di ricerca in Scienze Geologiche, Biologiche e Ambientali

XXXII ciclo

Francesca Bruno

La proteina tau a localizzazione nucleare quale marcatore
molecolare precoce della malattia di Alzheimer

Tesi di Dottorato

Tutor: Prof.ssa Concetta Federico

Co-tutor: Prof. Salvatore Saccone

AA.AA. 2016-2019

Indice

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI	4
PREMESSA E SCOPO DELLA RICERCA	5
RIASSUNTO	7
ABSTRACT	10
INTRODUZIONE	12
LA PROTEINA TAU	13
<i>Il gene MAPT</i>	<i>15</i>
<i>Organizzazione strutturale della proteina tau</i>	<i>22</i>
<i>Modifiche post-traduzionali di tau</i>	<i>27</i>
<i>Localizzazione neuronale di tau e suoi ruoli fisiologici</i>	<i>34</i>
IL RUOLO DI TAU NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER	37
<i>Iperfosforilazione della proteina tau</i>	<i>39</i>
<i>Processo di aggregazione di tau</i>	<i>42</i>
TAU NUCLEARE E NUCLEOLARE NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER	45
<i>Localizzazione nucleare di tau</i>	<i>46</i>
<i>Interazione tau-DNA</i>	<i>47</i>
<i>Ruolo funzionale di tau nucleare e nucleolare</i>	<i>48</i>
<i>Ruolo della proteina tau nucleolare nell' AD</i>	<i>50</i>
IL NUCLEOLO	52
<i>Morfologia nucleolare</i>	<i>53</i>
<i>Dinamiche nucleolari durante il ciclo cellulare</i>	<i>54</i>
<i>Il DNA ribosomiale e le NORs</i>	<i>56</i>
<i>UBTF, un fattore di trascrizione nucleolare multifunzionale</i>	<i>61</i>
<i>Il nucleolo nelle malattie neurodegenerative</i>	<i>62</i>
LA MALATTIA DI ALZHEIMER	63
<i>Neuropatologia dell'Alzheimer</i>	<i>66</i>
<i>Ipotesi biologiche della malattia di Alzheimer</i>	<i>70</i>
<i>L'ippocampo</i>	<i>75</i>

MATERIALI E METODI	80
COLTURE CELLULARI.....	81
<i>Coltura della linea cellulare SK-N-BE</i>	<i>81</i>
<i>Coltura di Linfociti da sangue periferico.....</i>	<i>83</i>
<i>Immunofluorescenza su colture cellulari.....</i>	<i>85</i>
SEZIONI DI TESSUTO UMANO	86
<i>Immunofluorescenza su sezioni di tessuto umano</i>	<i>86</i>
<i>Immunistoichimica su sezioni di tessuto umano</i>	<i>88</i>
REAL TIME PCR	89
<i>Protocollo di qPCR con kit SensiFAST™ SYBR® & Fluorescein.....</i>	<i>90</i>
<i>Estrazione di RNA da colture cellulari.....</i>	<i>91</i>
REVERSE TRANSCRIPTION PCR (RT-PCR)	94
QUANTITATIVE RT-PCR (QRT-PCR)	96
<i>Protocollo generale per qRT-PCR con kit SuperScript® III Platinum® SYBR Green One-Step.....</i>	<i>96</i>
ANALISI WESTERN BLOT	98
ANALISI STATISTICA.....	98
RISULTATI E DISCUSSIONI	99
IL GENE MAPT NELLE CELLULE SK-N-BE	100
<i>Splicing alternativo del gene MAPT.....</i>	<i>101</i>
<i>Le isoforme canoniche del gene MAPT.....</i>	<i>106</i>
LA PROTEINA TAU NUCLEARE	109
<i>Tau-1 nelle cellule SK-N-BE.....</i>	<i>109</i>
<i>AT8 nelle cellule SK-N-BE.....</i>	<i>111</i>
<i>Tau-1/AT8 e l'attività trascrizionale nel nucleolo.....</i>	<i>112</i>
<i>Localizzazione di altre forme fosforilate di Tau</i>	<i>116</i>
<i>Tau nucleare nei linfociti umani</i>	<i>117</i>
QUANTIZZAZIONE DELLA PROTEINA TAU	119
ANALISI TRASCRIZIONALE DEI GENI PER GLI RRNA NELLA LINEA CELLULARE SK-N-BE	120
LA PROTEINA TAU NELLE CELLULE NERVOSE UMANE.....	122
<i>Localizzazione dell'epitopo TAU-1</i>	<i>122</i>
<i>Localizzazione dell'epitopo AT8.....</i>	<i>124</i>
<i>Localizzazione dell'epitopo AT100.....</i>	<i>125</i>

CONCLUSIONI.....	129
BIBLIOGRAFIA.....	132

Elenco delle abbreviazioni

AD	Alzheimer's Disease	MTL	Medial Temporal Lobe
Akt	Protein kinase B	MTOC	MicroTubule Organizing Center
Act-D	Actinomycin D	NFR	Nucleosome Free Region
AMPK	AMP-Activated Protein Kinase	NFT	NeuroFibrillary Tangles
APP	Amyloid Precursor Protein	NLC	Nucleolin
A β	Amyloid-beta	NMDA	N-Methyl-D-Aspartate receptor
CA	Cornus Ammonis	NMP1	Nucleophosmin 1
CaMKII	Ca ²⁺ Calmodulin Dependent Kinase II	NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Cdk5	Cyclin-dependent kinase 5	NOR	Nucleolus Organiser Region
CK1	Casein Kinase 1	NoRC	Nucleolar Remodelling Complex
CNS	Central Nervous System	NPDK	Non-Proline Directed Protein Kinase
CTCF	CCCTC-binding factor	OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità
DFC	Dense Fibrillar Component	PAD	Phosphatase-Activating Domain
DG	Dentate Gyrus	PDPK	Proline-Directed Protein Kinases
DJ	Distal Junction	PHF	Paired Helical Filament
DYRK1A	Dual-specificity tyrosine phosphorylation-Regulated Kinase 1A	PIC	Pre-Initiation Complex
EC	Entorinal Cortex	PJ	Proximal Junction
ETS	External Transcribed Spacer	PKA	Protein Kinase A
FAD	Familial Alzheimer's Disease	PKC	Protein Kinase C
FC	Fibrillar Center	PNBs	PreNucleolar Bodies
GC	Granular Component	PNH	Perinucleolar Heterochromatin
GSK-3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β	PNS	Peripheral Nervous System
HAT	Histone Acetyltransferase	Pol I	RNA polymerase I
HDAC	Histone Deacetylase	PRD	Proline Rich Domain
HiC	High-throughput Chromosome capture	pRNAs	promotor - associated RNAs
HMGB1	High Mobility Group Boxes 1	<i>rDNA</i>	ribosomal gene cluster
IGS	InterGenic Spacer	RRN3	RNA polymerase I-specific transcription initiation factor RRN3
ITS	Internal Transcribed Spacers	SAD	Sporadic Alzheimer's Disease
LOAD	Late-Onset Alzheimer's Disease	SF	Straight Filament
MAP	Microtubule Associated Protein	SL1	Selective Factor 1
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase	SMC	Structural Maintenance of Chromosomes
<i>MAPT</i>	Microtubule - Associated Protein Tau gene	TAD	Topologically Associated Domain
MARK	Microtubule-Affinity Regulating Kinase	Tau	Tubulin associated unit
MBD	Microtubule Binding Domain	TTBK1/2	Tau Tubulin Kinase 1/2
MCI	Mild Cognitive Impairment	<i>TTF-I</i>	Transcription Termination Factor I
MTBR	Microtubule-Binding Region	<i>UBTF</i>	Upstream Binding Transcription Factor

Premessa e scopo della ricerca

Nel corso del triennio di dottorato, l'attività di ricerca è stata indirizzata verso lo studio della proteina tau a localizzazione nucleare e del suo possibile coinvolgimento nell'invecchiamento cellulare e nell'insorgenza della malattia di Alzheimer. La malattia di Alzheimer è una patologia neurodegenerativa progressiva, caratterizzata principalmente dalla presenza di aggregati fibrillari altamente insolubili, i grovigli neurofibrillari (NFTs), presenti nel soma dei neuroni piramidali dell'ippocampo contenenti la proteina tau in forma iperfosforilata. La presenza di tali grovigli comporta una progressiva perdita neuronale a livello del sistema nervoso centrale correlata con la progressione clinica della malattia di Alzheimer.

Sebbene la proteina TAU sia stata principalmente descritta come una proteina citoplasmatica, sono state anche osservate isoforme a localizzazione nucleare la cui funzione non è ancora stata chiarita. Dati presenti in letteratura e alcuni dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio di Genetica indicano che la proteina tau potrebbe interagire con il genoma e soprattutto le isoforme a localizzazione nucleolare potrebbero essere coinvolte negli eventi precoci della malattia Alzheimer.

Il programma di ricerca svolto nell'ambito del dottorato, e descritto della presente tesi, ha avuto come obiettivo principale l'identificazione di marcatori molecolari precoci della malattia di Alzheimer, ipotizzando che tali marcatori possano essere rappresentati da una specifica forma fosforilata di tau nucleare che, nei neuroni dell'ippocampo, determinerebbero una deregolazione della funzionalità nucleolare e quindi un'alterazione del ciclo cellulare, che indurrebbe la morte dei neuroni con un meccanismo non apoptotico. La parte sperimentale dell'attività di ricerca è stata condotta utilizzando una linea cellulare di neuroblastoma umano che, indotta con acido retinoico, differenzia in cellule simil-neuronali. Tali cellule sono state utilizzate come modello *in vitro* del differenziamento neuronale, con le cellule di neuroblastoma replicative assimilabili ai neuroblasti e quelle differenziate con acido retinoico assimilabili ai neuroni adulti *in vivo*. Inoltre, sono stati condotti esperimenti su sezioni di tessuto cerebrale, in particolare della regione CA1 dell'ippocampo, di individui a varie età (feto, giovane, adulto, senile) e a vari stadi della

malattia di Alzheimer (AD-I – AD-IV), dato che, in tale regione, si osserva la prima manifestazione di morte cellulare nell'Alzheimer. Questo ha consentito di estendere con analisi *in situ* (in sezioni di cervello umano) i risultati ottenuti *in vitro* (cellule di neuroblastoma).

Una parte della ricerca ha riguardato lo studio del gene *MAPT*, un gene che va incontro a splicing alternativo da cui si originano diverse isoforme della proteina tau, la più piccola delle quali è stata osservata avere localizzazione nucleare. Durante il suddetto studio sono state anche analizzate diverse forme fosforilate di tau, due delle quali (AT100 e AT8) si sono rivelate di grande importanza per lo scopo della presente ricerca.

Una parte del lavoro descritto nella presente tesi di dottorato è stato anche svolto presso l'Università "*Alfonso X el Sabio*" di Madrid (Spagna), sotto la guida della prof.ssa Laura Gil e il Dipartimento di Patologia del "*Hospital Universitario Fundación Alcorcón*" (Alcorcón, Spagna), responsabile la dott.ssa Ana B. Rebolledo.

Riassunto

La proteina tau è una proteina multifunzionale originariamente identificata come una proteina citoplasmatica associata ai microtubuli, caratterizzata da un complesso pattern di fosforilazioni e localizzata nel citoplasma e nel nucleo di cellule neuronali e non neuronali. Il gene che codifica per tale proteina è il gene *MAPT* (*Microtubule-Associated Protein Tau*) che mediante splicing alternativo codifica per 6 differenti isoforme di TAU, le cui dimensioni variano da 352 a 441 residui aminoacidici, differenzialmente espresse durante lo sviluppo del cervello umano e presentano numerosi potenziali siti di fosforilazione che ne modulano le proprietà. Le isoforme di tau a localizzazione nucleare e nucleolare sembrano svolgere un ruolo protettivo nei confronti di DNA ed RNA da eventi di danno come stress ossidativo e termico, suggerendo anche un potenziale ruolo della proteina tau nella biosintesi dei ribosomi e/o nell'organizzazione dei geni per gli rRNA.

La proteina tau riveste un ruolo centrale nella malattia di Alzheimer, dove si presenta con elevato numero di fosforilazioni costituendo i cosiddetti "*Paired Helical Filaments*" (PHFs) che rappresentano il "core" dei "*NeuroFibrillary Tangles*" (NFTs), caratteristici della malattia. Tuttavia, ancora oggi, non esistono metodi diagnostici precoci per la malattia di Alzheimer. Dati di letteratura e dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio di Genetica indicano che la proteina tau a localizzazione nucleolare possa avere un ruolo negli eventi precoci dell'AD, con un meccanismo che implicherebbe un'interazione, probabilmente diretta, con il DNA e/o l'RNA presente nel nucleolo.

L'attività di ricerca condotta ha avuto come obiettivo lo studio del ruolo della proteina tau a localizzazione nucleare nell'insorgenza della malattia di Alzheimer e nell'invecchiamento cellulare e di valutare il suo possibile utilizzo come marcatore molecolare precoce della malattia di Alzheimer. Per raggiungere tali obiettivi è stata utilizzata la linea cellulare di neuroblastoma umano SK-N-BE, le cui cellule sono assimilabili ai neuroblasti che, mediante induzione con acido retinoico, differenziano in cellule simil-neuronali. Inoltre, sono state utilizzate sezioni di tessuto cerebrale umano della regione dell'ippocampo di individui a varie età e a vari stadi della malattia di Alzheimer. L'utilizzo di tali sezioni di tessuto è stato possibile grazie alla collaborazione con l'università "*Alfonso X*

El Sabio" di Madrid e con il dipartimento di patologia del "*Hospital Universitario Fundación Alcorcón*" di Madrid che hanno fornito tale materiale biologico.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che nelle cellule SK-N-BE è presente l'isoforma più piccola della proteina tau, definita ON3R e composta di 352 residui aminoacidici. Tale isoforma è stata quindi analizzata sia nelle cellule SK-N-BE, sia nei neuroni del giro dentato e della regione CA1 dell'ippocampo. In particolare, è stata presa in considerazione la proteina tau con fosforilazioni in siti aminoacidici ritenuti importanti per la sua funzione nucleare, cioè per la possibile interazione tau-DNA, ossia nelle regioni PRD (*Prolin rich domain*) e MTBD (*Microtubule binding domain*), quali gli epitopi fosforilati AT8, AT100, T181 e S262, e l'epitopo non fosforilato Tau-1.

L'epitopo AT100 (regione Thr212/Ser214 nella forma fosforilata) aumenta gradualmente nel nucleo (e in modo particolare nel nucleolo) dei neuroni dal cervello più giovane a quello senile, indicando che esso possa svolgere un ruolo di protezione della cromatina. Tale protezione diminuirebbe gradualmente con l'invecchiamento cellulare o bruscamente nel caso di una alterazione della funzionalità di tau, come nella malattia di Alzheimer. L'epitopo AT100 può quindi essere considerato un marcatore molecolare di invecchiamento neuronale e che la sua scomparsa dal nucleo può essere considerata un segnale dell'insorgenza della malattia di Alzheimer.

La localizzazione di AT8 e Tau-1, corrispondenti rispettivamente alle regioni pSer202/pThr205 e Pro189/Gly207, ha dimostrato che probabilmente questa parte di tau è coinvolta nei cambiamenti conformazionali della proteina e che la presenza/assenza di fosforilazione è correlata alla funzionalità del nucleolo e al differenziamento cellulare. Tau-1 è presente nel nucleolo sia delle cellule replicative che di quelle differenziate, mentre AT8 è stato rilevato solo nelle cellule differenziate, dove occupa l'intero compartimento nucleolare. Inoltre, nelle cellule replicative in cui viene indotto il blocco della trascrizione con actinomicina-D (Act-D), AT8 compare nel nucleolo e insieme con Tau-1 si posiziona alla periferia del nucleolo, dove AT8 e Tau-1 colocalizzano con il fattore di trascrizione nucleolare UBTF. Questi risultati, ottenuti anche su linfociti indotti con PHA, indicano Tau-1 è probabilmente coinvolto nell'organizzazione e/o espressione dei geni per gli rRNA coadiuvando UBTF nel legame con l'rDNA, mentre l'epitopo AT8 di tau, la cui presenza nel nucleolo sembra essere correlata all'inattivazione trascrizionale dei geni per l'rRNA, può

essere considerato un marker di differenziamento neuronale e un regolatore dell'attività del nucleolo.

La localizzazione degli epitopi AT8 e Tau-1 nell'ippocampo umano di individui a varie età (da cervello fetale a cervello senile) e a vari stadi di gravità della malattia di Alzheimer (AD-I – AD-IV), ha mostrato che, nei nucleoli dei neuroni piramidali della regione CA1, AT8 tende a scomparire in età avanzata, così come risulta assente nelle cellule SK-N-BE replicative. La sua scomparsa, in un numero rilevante di neuroni di cervello senile e di Alzheimer, sembra indicare che tali cellule abbiano riacquistato, o si accingano a riacquistare, lo stato replicativo. Trattandosi di cellule differenziate terminalmente, tale processo presumibilmente non procede oltre, inducendo la morte dei neuroni con quello che potrebbe essere uno degli eventi precoci della malattia.

Abstract

Tau is a multifunctional protein, originally identified as a cytoplasmic protein associated with microtubules, it is characterized by a complex pattern of phosphorylation and is localised in the cytoplasm and nucleus in both neuronal and non-neuronal cells.

It is codified by the MAPT gene (*Microtubule-Associated Protein Tau*), and the alternative splicing, in the neuronal cells, results in six different isoforms, whose size varies from 352 to 441 amino acid residues, differentially expressed during human brain development and present numerous potential phosphorylation sites that modulate their properties. Nuclear and nucleolar tau isoforms seem to play a protective role against DNA and RNA from damage events such as oxidative and thermal stress, also suggesting its potential role in ribosome biosynthesis and / or in the organization of genes for rRNA.

Tau protein has a central role in Alzheimer's disease, where it is characterized by an high number of phosphorylations that bring to the development of "Paired Helical Filaments" (PHFs) representing the "core" of the "*NeuroFibrillary Tangles*" (NFTs). However, even today, there aren't early diagnostic methods for Alzheimer's disease. Literature data and preliminary data obtained in our Genetics laboratory indicate that the nucleolar tau protein may play a role in the early events of Alzheimer's disease, with a mechanism that would involve a probably direct interaction with the DNA and / or the RNA in the nucleolus.

My research's aim has been to study the role of the nuclear tau protein in the onset of Alzheimer's disease and in cellular aging, to evaluate its possible use as an early molecular marker of AD. The experimental activity was performed using the human neuroblastoma cell line SK-N-BE, whose cells are comparable to neuroblasts, that can differentiate into neuronal-like cells by retinoic acid induction. Furthermore, hippocampal sections of human brain tissue, of individuals at various ages and at various stages of AD were used. The tissue sections were provided by the "*University Alfonso X El Sabio*" and by the pathology department of the "*Fundación Alcorcón University Hospital*" in Madrid.

The results obtained in SK-N-BE cell line showed the presence of the smallest tau isoform, defined as ON3R and composed of 352 amino acid residues. This isoform was then analyzed both in SK-N-BE cell line and in neurons of the hippocampal dentate gyrus and

CA1 region. In detail, nuclear tau protein with phosphorylations in its main amino acid sites for the possible tau-DNA interaction was studied. These regions of interest are the PRD (*Prolin rich domain*) and MTBD (*Microtubule binding domain*), where are located the phosphorylated epitopes AT8, AT100, T181 and S262, and without phosphorylation Tau-1 respectively. The phosphoepitope AT100, which recognizes the phosphorylated Thr212/Ser214 residues, progressively increases in the nucleus (in particular in the nucleolus) of neurons from the youngest to the senile brain, showing that it may play a role in chromatin's protection. This protection could gradually decrease with cellular aging, or quickly by tau alteration, such as in Alzheimer's disease. AT100 epitope can be considered as a molecular marker of neuronal aging and its disappearance from the nucleus could be a signal of the onset of AD.

The AT8 and Tau-1 epitopes localisation, corresponding to pSer202/pThr205 and Pro189/Gly207 regions respectively, has shown that, this part of tau is probably involved in the protein's conformational changes and that the presence/absence of phosphorylation is related to the nucleolus and cell differentiation functionality. Tau-1 appears in the nucleolus of both replicative and differentiated cells, while AT8 is detected only in the differentiated cells, in the entire nucleolar compartment. Moreover, in the replicative cells treated with actinomycin-D (transcriptional inhibitor of the RNA pol-I), AT8 is shown in the nucleolus, and together with Tau-1, it is located in the nucleolar periphery, where both colocalize with nucleolar transcription factor UBTF. These results, obtained also on PHA-induced lymphocytes, indicate that Tau-1 may be involved in the organization and/or expression of rRNA genes, helping UBTF in the binding of rDNA. The AT8 epitope, that in the nucleolus may be related to transcriptional inactivation of the rRNA genes, could be a marker of the neuronal differentiation and a regulator of nucleolus activity.

The AT8 and Tau-1 epitopes localisation, in human hippocampus of individuals of various ages (from fetal brain to senile brain) and various stages of AD has shown that, in pyramidal neurons' nucleoli from CA1 region, AT8 gradually disappears in old age as well as is absent in the replicative SK-N-BE cells. Its disappearance, in a significant number of neurons from senile and AD brain, seems to indicate that cells re-entry, or preparing to re-entry, in replicative state. However, this process probably does not proceed over, inducing neuron's death and this could be one of the early events of disease.

Introduzione

La proteina tau

Sono passati più di 40 anni da quando la proteina tau è stata isolata per la prima volta e riconosciuta come proteina essenziale per ripristinare le normali caratteristiche dell'assemblaggio dei microtubuli *in vitro* (Weingarten et al., 1975). È stata chiamata *tau* (*tubulin associated unit*) proprio per la sua capacità di indurre “*tubule formation*” e pertanto, per decenni, gli studi su questa proteina sono stati rivolti esclusivamente su quella che si credeva essere la sua unica funzione, ossia regolare l'assemblaggio dei microtubuli. Tuttavia, è oggi risaputo che, sono molteplici le sue funzioni a livello neuronale vista la sua localizzazione in vari compartimenti subcellulari e che è presente anche in cellule non-neuronali, quali fibroblasti e linfociti (Thurston et al., 1996).

La proteina tau è codificata dal gene *MAPT* (*Microtubule-Associated Protein Tau*) ed espressa costitutivamente sia nel sistema nervoso centrale (CNS, *Central Nervous System*) che nel sistema nervoso periferico (PNS, *Peripheral Nervous System*). Nel CNS è prevalentemente espressa nei neuroni (Binder et al., 1985), risulta però presente anche negli astrociti di cervelli umani e negli oligodendrociti di cervelli di ratto. È soggetta a varie modifiche post-traduzionali come la fosforilazione e l'acetilazione che sembrano indirizzare la localizzazione della proteina nei diversi compartimenti in cui è presente. La fosforilazione rimane la modifica più studiata in quanto numerosi studi hanno dimostrato che essa, su siti specifici, influisce in modo differenziale sulle funzioni di tau e ciò rende tale modifica di grande rilevanza fisiologica (Mi e Johnson, 2006; Sohn et al., 2016).

L'interesse per tau aumenta in maniera significativa da parte della comunità scientifica quando nel 1986 viene dimostrato, da diversi gruppi di ricerca, che tau iperfosforilata costituisce i cosiddetti “*Paired Helical Filaments*” (PHFs) che rappresentano il “core” dei “*NeuroFibrillary Tangles*” (NFTs) nella malattia di Alzheimer (AD, *Alzheimer's Disease*) (Grundke-Iqbal et al., 1986). Tau isolata da questi aggregati risulta essere fosforilata circa tre volte più di tau presente in soggetti normali, questo comporta il suo distacco dai microtubuli, con conseguente accumulo della tau non legata e cambiamenti conformazionali che culminano con l'aggregazione e formazione dei NFTs (Iqbal et al., 2009). Dunque, la proteina tau, ha funzioni fisiologiche fondamentali nei neuroni, mentre alterazioni di tali funzioni si riscontrano in un gruppo di malattie neurodegenerative

conosciute come tauopatie, in particolare nella malattia di Alzheimer. Inizialmente, con la scoperta che mutazioni nella proteina precursore dell'amiloide (APP, *Amyloid Precursor Protein*) e nelle preseniline, entrambe responsabili della formazione del β -Amiloide ($A\beta$, *Amyloid-beta*), erano causa delle forme familiari di AD, la proteina tau anomala veniva considerata come un carattere distintivo secondario per la malattia (Hardy and Selkoe, 2002). Studi successivi hanno dimostrato invece che, la presenza di tau è fondamentale nel processo che porta alla disfunzione neuronale $A\beta$ -mediata (Ittner et al., 2010) anche se i meccanismi con cui la proteina tau anomala agisce rimangono ancora poco chiari (Wang and Mandelkow, 2016; Guo et al., 2017; Gao et al., 2018).

Il gene *MAPT*

Il gene *MAPT* (*Microtubule-Associated Protein Tau*) umano è un gene lungo 134 kb localizzato sul cromosoma 17q21 (Neve et al., 1986). La sequenza è ben conservata tra i mammiferi, con un'omologia del 97-100% con i primati non umani. Produce tre differenti trascritti di tau da 2, 6 e 8/9 Kb, espressi in modo differenziale nel sistema nervoso a seconda dello stadio di maturazione neuronale e del tipo di neurone: il trascritto da 2 Kb è principalmente localizzato nel nucleo; il trascritto da 6 Kb è presente nel cervello a livello dei neuroni; il trascritto da 8/9 kb è presente nella retina e nel PNS (Goedert et al., 1989; Bukar-Maina et al., 2016).

Il gene *MAPT*, anche chiamato gene *TAU*, contiene 16 esoni, 8 dei quali (2, 3, 4A, 6, 8, 10, 13, 14) vanno incontro a splicing alternativo (fig. 1). L'esone 1 è parte del promotore, viene trascritto ma non tradotto, così come l'esone 14. Gli esoni 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 e 13 sono costitutivamente espressi nel CNS umano adulto e nel PNS. L'esone 4A è espresso costitutivamente nel PNS umano adulto e nella retina ma non è espresso nel CNS. Gli esoni 2 e 3 vanno incontro a splicing alternativo e la proteina tau umana può contenere così l'esone 2, gli esoni 2 e 3, o nessuno dei due; inoltre l'esone 3 è espresso solo in combinazione con l'esone 2. L'esone 6 sembra essere espresso nel CNS umano adulto e nel PNS, ma a bassi livelli. Oltre all'esone 6 canonico, tre siti di splicing alternativi producono un frameshift con l'introduzione di codoni di stop e quindi codificano per tre varianti tau, 6c, 6p e 6d, che non possono legare i microtubuli (Luo et al., 2004a,b). L'esone 8 risulta essere presente solo nell'mRNA di tau di bovino. Gli esoni 9, 10, 11 e 12 coprono i domini di legame ai microtubuli (MTBD, *Microtubule Binding Domain*) di tau e di questi, solo l'esone 10 va incontro a splicing alternativo, pertanto, la sua assenza o presenza determinerà la codifica di tau con rispettivamente 3 o 4 domini di legame ai microtubuli. La proteina tau contenente la sequenza codificata dall'esone 10 è presente sia nel CNS che nel PNS umano, sebbene abbia una espressione variabile nel CNS, mentre è costitutivamente espresso nel PNS (Andreadis et al., 1992; Andreadis, 2005; Caillet-Boudin et al., 2015).

Sul gene *TAU* sono presenti delle isole CpG, una situata nella regione del promotore di circa 300 nt (CpG300), altre due isole molto più piccole di cui una di 27 nt (CpG27) che si trova a 13 kb a monte dell'esone 1 e l'altra di 21 nt (CpG21) che si trova immediatamente a monte

dell'esone 4. Oltre a queste tre isole CpG ne sono state identificate altre, tra cui una presente nell'esone 9, ed un'altra prevista nella regione codificante l'ultimo esone, ossia l'esone 13 (Caillet-Boudin et al., 2015).

All'interno del gene *TAU* è stato identificato un gene privo di introni, localizzato tra gli esoni 9 e 10, che codifica per la proteina saitohina di 128 aminoacidi (fig. 1). La sua funzione è poco chiara anche se polimorfismi di questo gene sono stati associati alla malattia di Parkinson e alla malattia di Alzheimer ad insorgenza tardiva (Lu et al., 2014a).

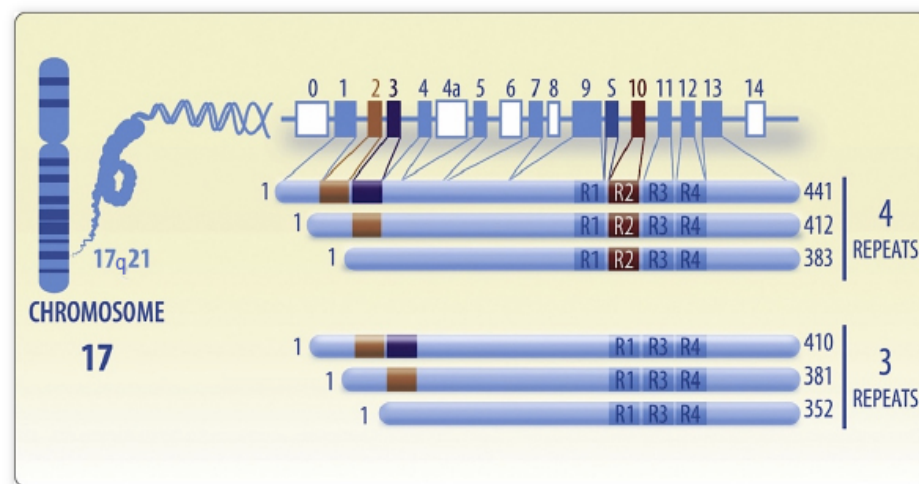


Figura 1. Il gene *MAPT* e le sue isoforme. Rappresentazione schematica del gene e delle sei isoforme canoniche di tau prodotte a seguito dello splicing alternativo degli esoni 2, 3 e 10 nel cervello umano adulto. S indica una sequenza di DNA che codifica per la proteina saitohina tra gli esoni 9 e 10 (Tapia-Rojas et al., 2019).

Lo splicing alternativo di *MAPT* e le sue isoforme

Lo splicing alternativo è un meccanismo che consente di generare mRNA multipli da un singolo trascritto. Inizialmente si pensava fosse un fenomeno raro, ora è risaputo che almeno il 90% dei geni umani vanno incontro a splicing alternativo e gli mRNA che ne derivano producono isoforme proteiche funzionalmente diverse, rendendo questo meccanismo il principale responsabile della complessità proteomica. Lo splicing alternativo determina la produzione di isoforme variabili con diverse affinità e/o funzioni senza alterare la struttura centrale della proteina.

Nel cervello umano adulto, nel trascritto primario del gene *MAPT*, lo splicing alternativo degli esoni 2, 3 e 10 genera sei differenti isoforme di tau ampiamente conosciute nel CNS, comprese in un intervallo di lunghezza che va da 352 a 441 aminoacidi e un range di massa

da 60 a 74 kDa, che sono espresse in maniera differente durante lo sviluppo postnatale del cervello umano (fig. 2A). Queste 6 isoforme sono denominate 2N3R, 1N3R, 0N3R, 2N4R, 1N4R, e 0N4R. Le designazioni 0N, 1N e 2N indicano rispettivamente l'esclusione di entrambi gli esoni 2 e 3 (E2 ed E3), l'inclusione di E2 e l'inclusione di entrambi gli esoni 2 e 3; 3R e 4R indicano rispettivamente l'esclusione e l'inclusione dell'esone 10 (E10) (Andreadis, 2005; Bukar Maina et al., 2016).

L'isoforma più piccola, chiamata *tau fetale 0N3R*, è presente solo nel cervello fetale e transitoriamente durante la neurogenesi adulta, ed è costituita da tre ripetizioni di legame ai microtubuli al C-terminale (3R) e 0 inserti all'N-terminale. Le altre cinque isoforme sono più grandi e si trovano prevalentemente nel cervello adulto, costituite da tre o quattro (3R/4R) ripetizioni di legame ai microtubuli e la presenza o assenza di 1 o 2 inserti N-terminali. Le isoforme mancanti dell'esone 10 sono riscontrate precocemente, o in cellule specifiche come le cellule granulari del giro dentato, mentre le isoforme derivanti dallo splicing degli esoni 2, 3 e 10 sono specifiche del cervello adulto, ma sembra che possano essere distribuite diversamente all'interno delle sottopopolazioni neuronali (Goedert et al., 1989). Esiste anche un'isoforma ad alto peso molecolare (120 kDa) denominata "*big tau*", che è espressa unicamente nei neuroni del PNS ma a volte è stata osservata anche nel midollo spinale e nei muscoli scheletrici e contiene un esone supplementare all'N-terminale che è l'esone 4A (Andreadis, 2005; Caillet-Boudin et al., 2015).

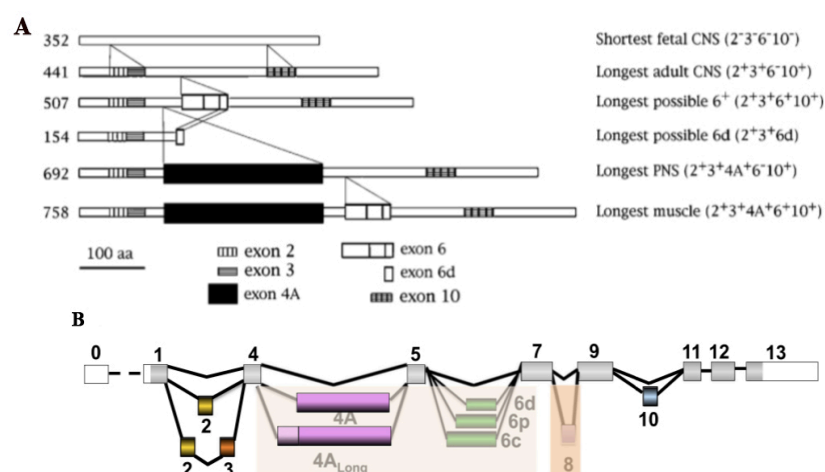


Figura 2. Isoforme di tau espresse nel CNS e PNS. (A) Isoforme espresse nel CNS, PNS e muscoli. In evidenza anche le due possibili isoforme contenenti le diverse varianti dell'esone 6. (B) Schema di splicing alternativo descritto in letteratura in cui l'inclusione di E4A ed E6 si verifica raramente nel cervello (rosa) e varia a seconda del sito di splicing al 3' utilizzato. L'inclusione di E8 (arancione) non è stata riportata nell'uomo ma è descritta in diversi modelli animali (modificate da Andreadis, 2005; Boudin et al., 2015).

Nel sistema nervoso periferico, agli esoni alternativi appena descritti sono spesso aggiunti altri esoni quasi assenti nel CNS. Ad esempio, l'esone 4A (E4A) è presente specificamente nel PNS e nella retina; l'esone 6 (E6) si trova nel midollo spinale e nel muscolo scheletrico. Le lunghezze di questi ultimi due esoni, E4A ed E6, cambiano a seconda della scelta del sito di splicing al 3'; in effetti, esistono due possibili siti di splicing al 3' per E4A (E4A, E4ALong), e tre per E6 (E6c, E6p, E6d) (Fig. 2B). L'inclusione di E6p ed E6d dà origine a proteine tronche prive di siti di legame ai microtubuli, le proteine contenenti le sequenze codificate dagli esoni E6c o E6d sono state identificate, attraverso anticorpi specifici, in diversi tessuti come il cervello e il tessuto muscolare e potrebbero interferire con il ruolo di tau nel trasporto assonale (Andreadis, 2005).

Lo splicing alternativo del gene *MAPT* è regolato in base allo stadio di sviluppo e al tipo di tessuto (tab. 1 e 2). Gli esoni 2, 3 e 10 sono presenti in tutti e tre gli mRNA di tau. Nell'adulto sono costitutivamente inclusi nell'mRNA di tau da 8/9 kb specifico per il PNS, che include sempre anche l'esone 4A. Le isoforme di tau contenenti E3 sono minori nel CNS, assenti nel midollo spinale e prevalenti nel muscolo scheletrico. Il modello di espressione dell'esone 10 mostra una differenza cruciale tra roditore e uomo infatti risulta essere costitutivo nei roditori adulti mentre rimane regolato nel CNS adulto umano. L'esone 4A è limitato al PNS e alla retina ed è specificamente associato all'mRNA di tau da 8/9 kb. L'esone 6 è incluso in entrambi gli mRNA tau da 6 e 8/9 kb e si trova sia nel feto sia nell'adulto umano, ma è altamente espresso nell'adulto dove scompare dal PNS ma persiste nel CNS (Andreadis, 2005).

Tabella 1. Esoni di *TAU* espressi nel CNS e PNS durante lo sviluppo ed esoni presenti negli mRNA di tau (Andreadis, 2005).

Exon	Fetal CNS	Adult CNS	Adult PNS
2	no	yes, regulated	yes, constitutive
3	no	yes, regulated	yes, constitutive
4A	no	no	yes, constitutive
6	yes	yes, regulated	yes, regulated
10	no	yes, regulated (human) yes, constitutive (mouse)	yes, constitutive

Tau exon distribution in tau mRNAs			
mRNA (kb)	Compartment	Tissue	Exons
2	nuclear	ubiquitous	2, 3, 10 regulated
6	axonal	CNS and PNS	2, 3, 6, 10 regulated
9	axonal	retina and PNS	2, 3, 4A, 10 constitutive; 6 regulated

Tabella 2. Livelli di espressione degli esoni *TAU* nei tessuti umani (Andreadis, 2005).

Tissue	Exon						Major isoforms
	2	3	6	6p	6d	10	
Fetal brain	-	-	+	?	?	-	2 ⁻ 3 ⁻ 6 ⁻ 10 ⁻
Adult cortex	+++	+	+	?	?	+++	2 ⁻ 3 ⁻ 6 ⁻ 10 ⁻ , 2 ⁻ 3 ⁻ 6 ⁻ 10 ⁺ , 2 ⁺ 3 ⁻ 6 ⁻ 10 ⁻ , 2 ⁺ 3 ⁻ 6 ⁻ 10 ⁺
Cerebellum	+++	+	++	?	?	+++	as in adult brain
Hippocampus	+++	+	++	?	?	+++	as in adult brain
Spinal cord	++	+	++	+	+	++	2 ⁻ 3 ⁻ 6 ⁻ 10 ⁻ , 2 ⁻ 3 ⁻ 6 ⁻ 10 ⁺
Skeletal muscle	+++	++	++	+	+	+++	2 ⁺ 3 ⁻ 6 ⁻ 10 ⁺ , 2 ⁺ 3 ⁻ 6 ⁻ 10 ⁺

Gli effetti dello splicing alternativo sulle funzioni della proteina tau e le conseguenze sulla morfogenesi neuronale e sulla salute risultano essere molto interessanti. Le varianti alternative di tau possono influenzare funzioni specifiche della proteina: gli esoni 2 e 3 modulano le interazioni con la membrana assonale, l'esone 4A altera la spaziatura dei microtubuli, l'esone 6 influenza l'allungamento neuritico e l'esone 10 infine, aumenta l'affinità con i microtubuli. Molti di questi domini presentano numerosi potenziali siti di fosforilazione; l'inclusione di questi domini può alterare l'affinità della proteina per i microtubuli e influenzare le sue interazioni con altri componenti del citoscheletro o della membrana, incluse le chinasi e le fosfatasi. L'N-terminale di tau, che interagisce con la membrana plasmatica, interagisce anche con la proteina fyn, un membro della famiglia delle tirosin-chinasi non recettoriali, quindi gli esoni 2 e 3 possono modulare l'interazione di tau con componenti di membrana specifici coinvolti nella trasduzione del segnale. Le ripetizioni presenti al C-terminale di tau, inclusa quella codificata dall'esone 10, agiscono come domini di legame ai microtubuli, pertanto, la sua presenza aumenta l'affinità della proteina per i microtubuli e può essere importante nella transizione da un citoscheletro fetale abbastanza instabile a quello adulto più stabile (Andreadis, 2005; Caillet-Boudin et al., 2015).

Da queste osservazioni, diventa ovvio che lo splicing alternativo di *TAU* e i suoi effetti sulle modifiche post-traduzionali della proteina, influenza la localizzazione e conformazione di tau e quindi la sua capacità di interazione con altre molecole.

Mutazioni del gene *MAPT*

Ad oggi sono state descritte numerose mutazioni patologiche del gene *MAPT*, e la maggior parte di queste sono localizzate principalmente negli esoni 9-13 e comprendono mutazioni missenso, silenti e delezioni, ma possono anche essere localizzate a livello intronico, infatti ne sono state identificate al confine tra E10 e I10 e sembrano indurre tauopatie (fig. 3).

Tutte le mutazioni introniche e alcune esoniche, per lo più silenti, influenzano lo splicing dell'esone 10, alterando il rapporto tra le isoforme 3R e 4R mediante la modifica della struttura secondaria ad ansa-uncino (stem-loop) che si forma al confine tra E10 e I10 e che viene considerata un "hot spot" per le mutazioni del gene *MAPT*. Analizzando tale struttura

è emerso che questo loop maschera il sito di riconoscimento di splicing, permettendo l'escissione dell'E10 dall'mRNA maturo. Sebbene i meccanismi non siano ancora chiari, la presenza di mutazioni introniche a livello di questa struttura determinano l'errata inclusione dell'E10, quindi diminuisce la stabilità del loop, portando all'aumentata inclusione dell'E10 nell'mRNA maturo, con un conseguente aumento di trascritti che codificano per isoforme di tau 4R. (McCarty et al., 2015).

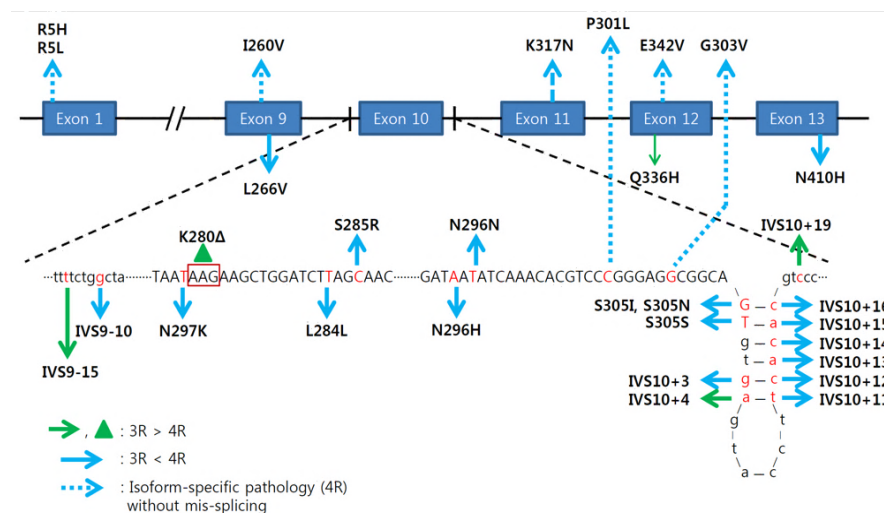


Figura 3. Mutazioni del gene MAPT associate a tauopatie. Conseguenze delle mutazioni patologiche del gene MAPT su specifiche isoforme tau a causa dell'errato splicing, la freccia verde o punta di freccia, indicano l'aumento delle isoforme 3R rispetto alle 4R e la freccia blu indica aumento delle isoforme 4R rispetto alle 3R; freccia blu tratteggiata indica le isoforme patologiche 4R non causate da errori di splicing (Park et al., 2016).

Per quanto riguarda le mutazioni missenso o delezioni negli esoni, non sempre causano alterazioni del rapporto 3R e 4R, ma possono influenzare l'assemblaggio e il legame di tau ai microtubuli, riducendone così la loro stabilità oltre che aumentare i livelli di tau libera nel citoplasma dei neuroni che possono in definitiva portare all'aggregazione e conseguente formazione dei NFTs. Un esempio sono le mutazioni che cadono all'interno degli esoni 1, 9, 11, 12 e 13, ma anche le mutazioni P301L e P301S dell'esone 10. Viceversa, alcune mutazione, come Q336H, hanno una maggiore capacità di promuovere l'assemblaggio dei microtubuli (Park et al., 2016). Un'altra mutazione che ha interessato l'aggregazione della proteina tau è S320F nell'esone 11, che pare conferisca maggiore velocità di nucleazione di tau, portando alla produzione di fibrille (Strang et al., 2019).

I meccanismi alla base della neurodegenerazione causata da un'alterazione nel rapporto tra isoforme di tau 3R e 4R rimangono poco chiari, ma si ritiene che la propensione all'aggregazione, isoforma-dipendente, diviene patologica quando il rapporto 3R/4R è alterato. È interessante notare che, sono state rilevate isoforme 4R patologiche di tau anche in assenza di splicing errato dell'E10 e questo suggerisce che sia dovuto ad una mutazione del gene *MAPT*; è raro invece che, mutazioni del gene *MAPT* possano portare splicing alterato degli esoni 2 e 3 (Park et al., 2016). Recentemente è emerso come, vi è una stretta correlazione tra uno specifico pattern di isoforme e il tipo cellulare proprio di una determinata regione anatomica del cervello (Wang and Mandelkow, 2016).

Organizzazione strutturale della proteina tau

La proteina tau umana è una proteina a basso peso molecolare, in grado di promuovere l'assemblaggio dei microtubuli e stabilizzare i loro polimeri mediante legame con la tubulina. Appartiene alla più grande famiglia di proteine note come MAPs (*Microtubule Associated Proteins*), ed è insolitamente idrofila, quindi altamente solubile, ed anche stabile in condizioni acide al calore (Wang and Mandelkow, 2016). Viene definita "*natively unfolded*" in quanto diversi studi biofisici hanno rivelato come essa sia una proteina costitutivamente non ripiegata, ciò significa che la catena polipeptidica è altamente flessibile e mobile, contenente poche strutture secondarie che sono inoltre transitorie (von Bergen et al., 2005). Questo dimostra che tau potrebbe formare interazioni con una molteplicità di altre proteine cellulari, ma che mostra anche una preferenza per le interazioni tra i suoi stessi domini che possono essere paragonati ad una "*paper clip*" (fig. 4B), in quanto i domini N-terminale e C-terminale si avvicinano l'un l'altro e questa è la tipica struttura di tau libera nel citoplasma (Jeganathan et al., 2008; Guo et al., 2017). Uno studio di risonanza magnetica nucleare (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) ha confermato che tau presenta una struttura disordinata (priva sia di strutture secondarie che terziarie) e proprio questa non favorisce l'aggregazione; tuttavia alcuni segmenti di tau mostrano un'elevata propensione a formare β -sheet e questi possono essere importanti per l'aggregazione di tau (fig. 4A) (Venkatramani and Panda, 2019).

L'analisi della struttura primaria della proteina tau, dimostra che essa consiste di due domini principali: una porzione N-terminale acida, seguita da una regione ricca in proline (PRD, *Proline Rich Domain*), denominata *dominio di proiezione* e da una regione C-terminale che invece costituisce la parte basica della proteina, denominata *dominio di legame ai microtubuli*; pertanto la sequenza polipeptidica codificata dagli esoni 2 e 3, conferisce acidità a tau, mentre l'esone 10 codifica per una sequenza carica positivamente che contribuisce al carattere basico della proteina. Dunque, tau può essere considerata come un dipolo dotato di due domini aventi carica opposta e questa asimmetria delle cariche è importante per le interazioni con i microtubuli e altri elementi, per il suo folding e per l'aggregazione di tau, che possono essere modulati da modifiche post-traduzionali (Sergeant et al., 2008; Mandelkow and Mandelkow, 2012).

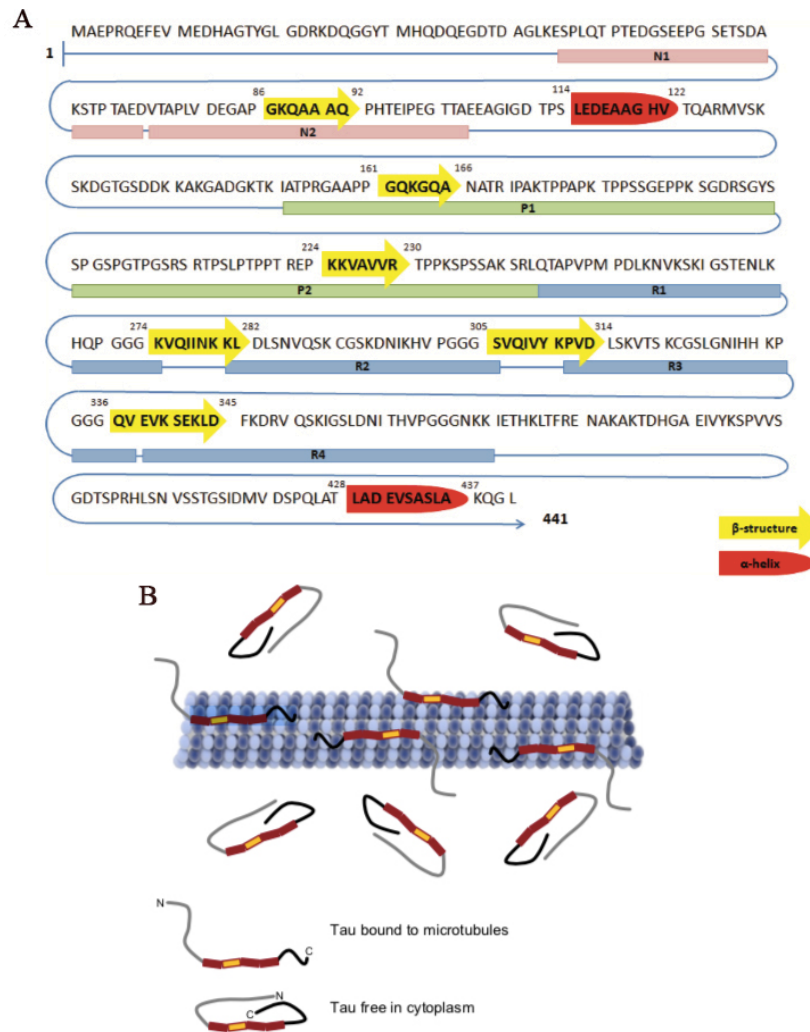


Figura 4. Sequenza primaria aminoacidica con probabili strutture secondarie dell'isoforma tau più lunga nel CSN e tau legata ai microtubuli e libera nel citoplasma. A) N1 e N2 denotano le sequenze codificate dagli esoni 2 e 3. Da R1 a R4 vi sono i domini di legame ai microtubuli codificati dagli esoni 9-12. I domini con struttura a β-sheet e α-elica sono mostrati rispettivamente in giallo e rosso; (B) Rappresentazione di tau legata ai microtubuli mediante i MBD e tau libera nel citoplasma in cui i domini N e C-terminali sono strettamente associati dando origine al modello di conformazione "paper-clip" proposto per tau (modificata da Šimić et al., 2016; Guo et al., 2017).

Dominio di Proiezione N-terminale

L'estremità N-terminale della proteina tau viene definita *dominio di proiezione*, in quanto si protrude dalla superficie dei microtubuli quando tau è ancorata ad essi, per poter interagire con altri elementi del citoscheletro e con la membrana plasmatica dei neuroni (fig. 4B). Agisce da distanziatore tra i microtubuli nei fasci neuronali e questa caratteristica consente di mantenere una particolare spaziatura tra essi, regolando così il diametro assonale. Ad esempio, nei neuroni del PNS che spesso proiettano un assone molto lungo con grande diametro, è presente un'altra sequenza all'N-terminale, quella codificata dall'esone 4A e ciò suggerisce che le regioni N-terminali sono fondamentali

nell'organizzazione e nella stabilizzazione di alcuni tipi di assoni (Buée et al., 2000). Per quanto riguarda le interazioni con altri elementi del citoscheletro, tale dominio determina il legame di tau alla spectrina e ai filamenti di actina, permettendo ai microtubuli di interagire con i neurofilamenti.

La regione N-terminale presenta due sequenze di 29 aminoacidi, codificate dagli esoni 2 e 3, che ne conferiscono una diversa lunghezza all'N-terminale e può essere suddivisa in due sub-regioni: una più prossimale ricca in residui acidi ed una più distale ricca in proline (PRD) (fig. 5). Per quanto riguarda la regione ricca in residui acidi, che comprende le regioni codificate dagli esoni 2 e 3, questa sembra interagire con diverse proteine in maniera isoforma-specifica: le isoforme 2N interagiscono con l'apolipoproteina A1 (ApoA1), mentre le 0N con la β -sinucleina e ciò mette in evidenza interazioni proteiche distinte delle diverse isoforme di tau, suggerendo quindi diverse funzioni nel tessuto cerebrale (Liu et al., 2016). La PRD invece, contiene i motivi SerPro o ThrPro che sono bersagli delle proteine chinasi proline-dirette e sette motivi Pro-X-X-Pro che sono siti di legame per proteine con domini SH3 inclusa fyn. L'associazione di tau con fyn dipende dal suo stato di fosforilazione, infatti i PHFs insolubili, isolati da cervelli AD, non si legano al dominio SH3 di fyn. Pertanto, questo suggerisce che lo stato di fosforilazione di tau non soltanto influenza la stabilità dei microtubuli ma produce anche alterazioni nella plasticità neuronale (Mufson et al., 2015; Zabik et al., 2017).

I diversi inserti N-terminali apparentemente non influenzano l'assemblaggio dei microtubuli, ma uno studio recente ha proposto che possono regolare la stabilizzazione di essi: tau tronca nella Gln124 della regione N-terminale, lega più fortemente i microtubuli rispetto alla proteina tau di lunghezza normale e protegge contro la depolimerizzazione (Derisbourg et al., 2015). Altri studi invece, suggeriscono che alcune isoforme di tau, in particolare l'1N, potrebbero favorire l'aggregazione di tau e contribuire ai processi neurodegenerativi, inoltre, le isoforme 0N sembrano essere efficientemente presenti negli assoni, mentre le 2N4R sembrano essere parzialmente trattenute nei corpi cellulari e nei dendriti (Park et al., 2016; Zempel et al., 2017). Questi e altri risultati dimostrano che le diverse isoforme di tau N-terminale svolgono ruoli distinti nei neuroni. È interessante notare come, quasi la metà delle proteine interagenti con la regione N-terminale di tau sono proteine legate alla membrana e che la maggior parte sono localizzate nei mitocondri.

Questo risultato non è inaspettato in quanto è stato dimostrato che tau altera la dinamica e la funzione mitocondriale, la mitofagia e il trasporto mitocondriale (Hu et al., 2016).

Dominio di legame ai microtubuli C-terminale

L'abilità di tau di legare i microtubuli è mediata dal suo *dominio di legame ai microtubuli* situato all'estremità C-terminale (fig. 5). Tale regione si presenta costituita da domini ripetuti (R1-R4) codificati dagli esoni 9-12 che portano alla produzione di tau a 4 ripetizioni (4R) e 3 ripetizioni (3R). Ciascuna ripetizione consiste di sequenze ripetute, simili ma non identiche, di 31 o 32 residui, di cui 18 aminoacidi altamente conservati, che rappresentano la regione minima richiesta per il legame della tubulina, separati da domini inter-repeats costituiti da 13 o 14 aminoacidi (R1-R2, R2-R3, R3-R4) meno conservati. Il dominio C-terminale dunque, può essere suddiviso in tre regioni: basica, di reale legame alla tubulina e acida carbossi-terminale.

Le due isoforme possibili (3R/4R) sono mantenute in un rapporto equilibrato (1:1) nei cervelli umani adulti, con 3R prodotte principalmente durante lo sviluppo e 4R prodotte in età adulta. L'alterazione di questo rapporto, come già accennato, è coinvolta in diverse taopatologie e nell'AD, in quest'ultima, non è emerso un modello chiaro poiché le aree vulnerabili del cervello contenenti i grovigli tau mostrano in alcuni casi isoforme aumentate di tau 4R e in altri di tau 3R (Hyman et al., 2005; Naseri et al., 2019). Uno studio condotto da Goode e collaboratori, ha dimostrato che sia in tau 3R che 4R, le prime due ripetizioni e la loro inter-repeat costituiscono il "*core microtubule binding domain*" che presenta alcune somiglianze ma anche molte differenze e quindi le isoforme sono chiaramente diverse. Le isoforme 4R promuovono più efficacemente l'assemblaggio dei microtubuli rispetto alle 3R ed il motivo sta nel fatto che la parte maggiormente coinvolta nella polimerizzazione è compresa tra le ripetizioni R1 ed R2 e più precisamente il peptide $_{274}KVQIINKK_{281}$, presente unicamente nella tau 4R e quindi responsabile della differenza di affinità di legame. Invece, la regione che fiancheggia immediatamente la terza ripetizione nelle 3R tau, gioca un ruolo significativo nel facilitare la sua interazione con i microtubuli a differenza della 4R tau (Goode et al., 2000).

I microtubuli sono strutture sulle quali, come è noto, avviene il trasporto di sostanze, attraverso due proteine motrici che sono la chinesina, che provvede al trasporto assonale

anterogrado e la dineina che provvede al trasporto retrogrado. A tal proposito un dato interessante è stato ottenuto tramite uno studio sulla velocità di scorrimento della chinesina su microtubuli stabilizzati con taxolo ma non contenenti tau e microtubuli stabilizzati da tau 4R, in quanto non vi era alcuna differenza tra i due tipi di microtubuli, invece, sui microtubuli stabilizzati da tau 3R la velocità di scorrimento era maggiore rispetto al caso precedente. Questo dimostra che la presenza o l'assenza dell'esone 10 non solo influenza le interazioni di tau con i microtubuli, ma anche la velocità del trasporto assonale. Inoltre, è stato riportato che la 4R tau è soggetta ad essere fosforilata *in vitro* ed è più probabile che si aggregi in filamenti rispetto alla 3R tau e questo potrebbe essere rilevante per lo sviluppo di patologie (Tapia-Rojas et al., 2019).

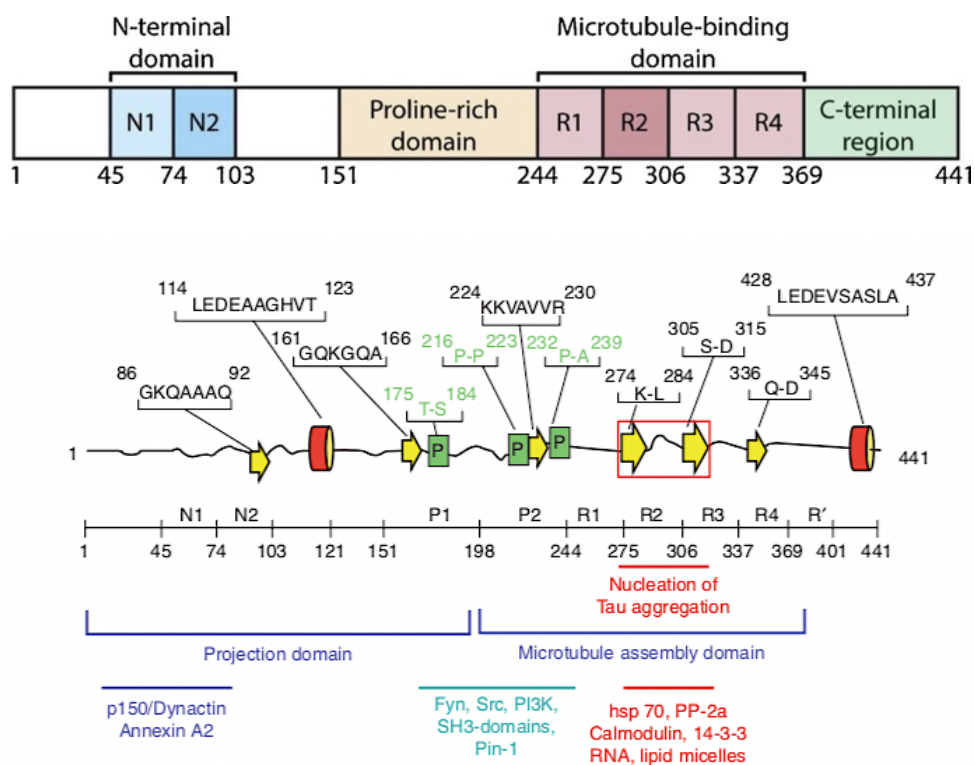


Figura 5. Domini ed elementi strutturali di Tau. In alto: La proteina tau e i suoi domini N-terminale (blu), PRD (beige), MBD (rosa) e C-terminale (verde). In mezzo: schema dei domini di tau dedotta da NMR. La maggior parte della catena è non ripiegata (linee nere), con poche strutture secondarie (α -eliche rosse, β -sheet giallo, eliche ricche in proline verde), il riquadro in rosso indica la regione dei due motivi esapeptidici responsabili dell'aggregazione di tau. In basso: posizione approssimativa dei siti di interazione con altre proteine (Mandelkow and Mandelkow, 2012; Naseri et al., 2019).

Modifiche post-traduzionali di tau

Come la maggior parte delle proteine, tau è soggetta a diverse modifiche post-traduzionali. La fosforilazione è sicuramente la modifica più studiata in quanto nell'AD è noto che questa sia particolarmente aumentata in maniera anomala, in contrapposizione alla normale fosforilazione fisiologica. Sebbene gli studi si concentrino su condizioni patologiche, le modificazioni si verificano anche in condizioni fisiologiche. Di seguito si riassumono le modifiche più rilevanti di tau e come queste potrebbero influire sulla sua funzione (fig. 6).

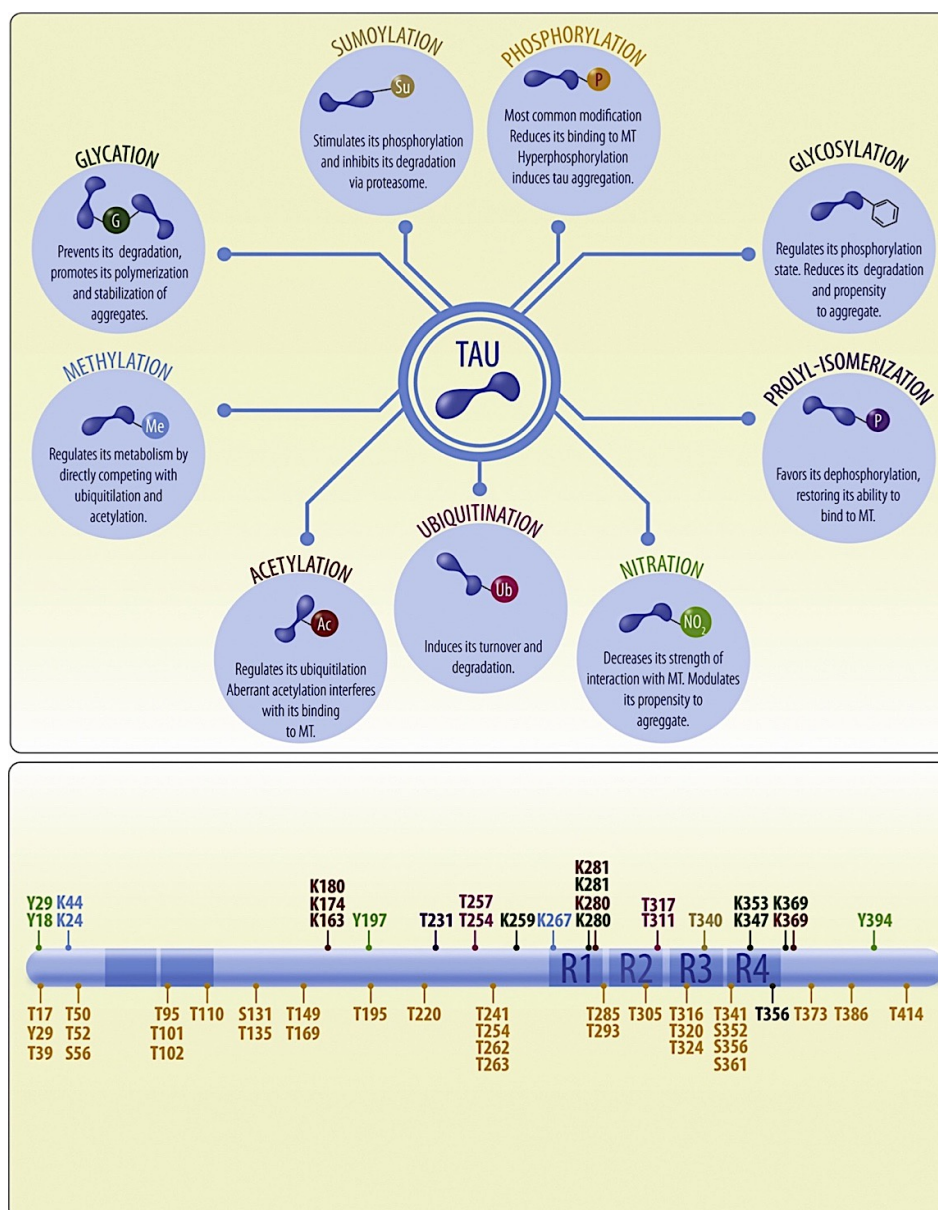


Figura 6. Modifiche post-traduzionali di tau. Schema delle diverse modificazioni post-traduzionali a cui va incontro la proteina tau. Il pannello inferiore mostra i siti tau che subiscono modifiche post-traduzionali in condizioni fisiologiche (Tapia-Rojas et al., 2019).

Fosforilazione

La fosforilazione è la modifica post-traduzionale più studiata della proteina tau. È regolata durante il neurosviluppo, infatti, la proteina tau fetale è maggiormente fosforilata rispetto a tau presente nell'adulto per l'attivazione delle fosfatasi (Kanemaru et al., 1992). Risulta essere la più importante delle modificazioni in quanto controlla l'affinità della proteina per i microtubuli ed è regolata a livello intracellulare da un'attività in equilibrio tra diverse proteine chinasi e fosfatasi.

L'isoforma tau 2N4R del cervello umano presenta 85 potenziali siti di fosforilazione (fig. 7) tra cui 45 serine, 35 treonine e 5 tirosine che comprendono rispettivamente il 53, 41 e 6% dei residui fosforilabili (Martin et al., 2011). Dato il gran numero di potenziali siti di fosforilazione su tau, non è sorprendente che essa abbia un profondo impatto sulla funzione fisiologica della proteina, infatti, sono stati identificati più di 31 siti associati a funzioni fisiologiche e altri 16 sia a funzioni fisiologiche che patologiche (Martin et al., 2011).

La fosforilazione di tau è strettamente controllata da un equilibrio tra proteine chinasi e fosfatasi. Le proteine chinasi che agiscono su questi siti sono di tre classi: *proteine chinasi proline dirette* (PDPK, *Proline-Directed Protein Kinases*) che includono GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β), Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) e MAPK (mitogen activated protein kinase); *proteine chinasi non proline dirette* (NPKK, *Non-Proline Directed Protein Kinase*) come TTBK1/2 (Tau Tubulin Kinase 1/2), CK1 (Casein Kinase 1), DYRK1A (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A), MARK (microtubule-affinity regulating kinase), Akt (protein kinase B), PKA (Protein Kinase A), PKC (Protein Kinase C), AMPK (AMP-Activated Protein Kinase) e CaMKII (Ca²⁺ Calmodulin Dependent Kinase II); *proteine tirosin-chinasi* come Src, fyn, Abl, e Syk (Martin et al., 2011).

Le PDPK sembrano influenzare l'auto-aggregazione di tau e in particolare per GSK-3 β sono stati ipotizzati due tipi di meccanismi di fosforilazione, uno indiretto che prevede una fosforilazione precedente da parte di un'altra chinasi (e sembra quello utilizzato per la regione di legame ai microtubuli), e uno diretto che sembra non avere effetti sui microtubuli (Avila et al., 2004).

Le NPKK invece, agiscono a livello del MBD portando ad una riduzione dell'affinità di legame tra tau ed i microtubuli.

La maggior parte dei siti fosforilati di tau si trovano fuori dai domini di legame ai microtubuli, eccetto Ser262 (R1), Ser285 (inter-repeat R1-R2), Ser305 (inter-repeat R2-R3), Ser324 (R3), Ser352 (R4) e Ser356 (R4). In particolare, la fosforilazione su Ser262, Ser293, Ser324 e Ser356, localizzati nel motivo KXGS dei domini R1, R2, R3 e R4 rispettivamente, riduce il legame di tau ai microtubuli; la Ser262 inoltre, riduce drasticamente l'affinità di tau per i microtubuli *in vitro* ma questo sito da solo, presente nella tau fetale, nella tau dell'adulto e nelle proteine tau iperfosforilate trovate nei NFTs, è insufficiente ad eliminare questo legame (Sergeant et al., 2008).

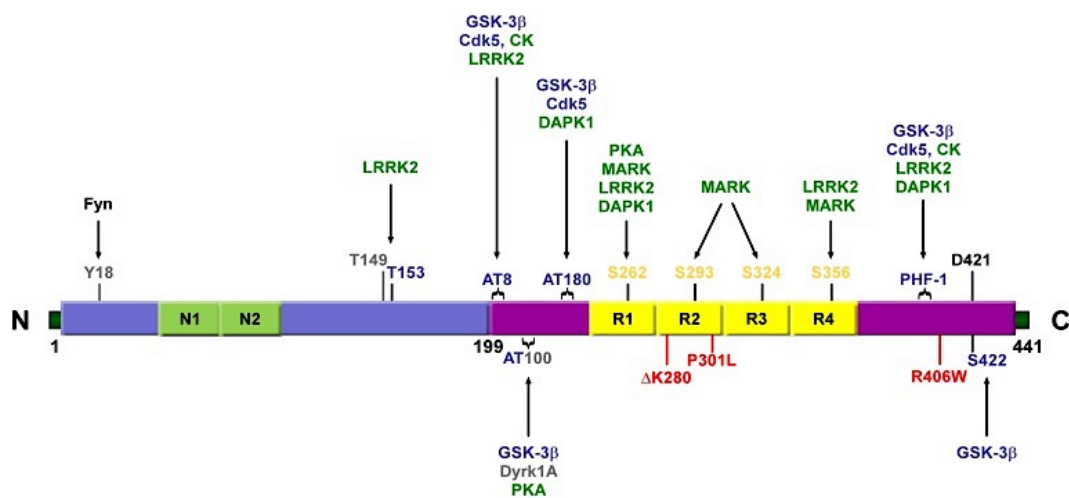


Figura 7. Potenziali residui fosforilabili nell'isoforma tau 2N4R. Rappresentazione dei potenziali siti di fosforilazione sulle diverse regioni della proteina tau e le corrispondenti proteine chinasi agenti su di essi (da: Tenreiro et al., 2014).

Le fosforilazioni di tau su Thr231, Ser235 presenti a livello della PRD e Ser262 influenzano in modo simile il legame di tau ai microtubuli, riducendone l'affinità rispettivamente del 26%, il 9% e il 33% (Sengupta et al., 1998); i siti fosforilabili all'interno del PRD all'N-terminale riducono la capacità di tau di promuovere la nucleazione dei microtubuli, questo indica che anche le regioni di tau al di fuori del MBD influenzano l'associazione di tau con il citoscheletro (Shanani and Brandt, 2002; Mi and Johnson, 2006).

La fosforilazione regola anche la localizzazione subcellulare della proteina tau. L'anticorpo Tau-1 in origine è stato indicato come anticorpo che rileva la proteina tau presente negli assoni e per questo veniva chiamata "*proteina assonale*" (Binder et al., 1985). Successivamente è stato scoperto che Tau-1 riconosce principalmente tau quando non è fosforilata, tra gli aminoacidi 189 e 207 (Szendrei et al., 1993) e quando le sezioni cerebrali venivano trattate con fosfatasi, Tau-1 veniva rilevata nel soma e nei dendriti dei neuroni

(Papasozomenos, 1997). La fosforilazione regola inoltre, la localizzazione di tau sulla membrana plasmatica (Pooler et al., 2012), nel nucleo (Sultan et al., 2011) e nelle vescicole esocitotiche tra gli altri siti intracellulari (Noble et al., 2013). La fosforilazione di tau su Ser262 e Ser356 nei domini di legame ai microtubuli è necessaria per lo sviluppo dei processi cellulari, mentre la fosforilazione di motivi Ser/Thr Pro nelle regioni prossimali ai domini di legame ai microtubuli bloccano la crescita dei neuriti (Biernat and Mandelkow, 1999). Dunque, la proteina tau si trova in tutti i compartimenti delle cellule nervose e non è esclusivamente una proteina assonale. Sia i fattori di fosforilazione che quelli di trascrizione possono essere coinvolti nel traffico di tau e nello smistamento cellulare (nucleare, assonale o somatodendritico).

Tau può essere anche defosforilata da numerose fosfatasi tra cui PP1, PP2A, PP2B e PP5 con PP2A che sembra essere la fosfatasi che agisce sulla maggior parte dei siti di fosforilazione nel cervello. Come le chinasi, le fosfatasi hanno molti effetti fisiologici diretti o indiretti e controbilanciano l'azione delle chinasi. Sono associati direttamente o indirettamente ai microtubuli, infatti, è stato dimostrato che la proteina tau agisce da collegamento tra PP1 e tubulina, mentre la PP2A è direttamente legata ai microtubuli mediante interazioni ioniche. Va sottolineato dunque che, sia la down-regolazione della defosforilazione di tau, sia l'eccesso di fosforilazione sono implicate nella fosforilazione aberrante di tau osservata nei cervelli affetti da tauopatie (Liu et al., 2005; Guo et al., 2017).

Acetilazione

Nella proteina tau umana sono presenti più di 40 residui di lisina, che sono soggetti a diverse modificazioni post-traduzionali, tra cui acetilazione, ubiquitilazione e SUMOilazione che ne regolano in modo differente la sua funzione. L'acetilazione di tau sta emergendo come un'importante modifica post-traduzionale rilevante sia per le sue funzioni fisiologiche che per quelle patologiche (Wang and Mendelkow, 2016). È controllata da due famiglie di enzimi, le istone-acetiltransferasi (HATs, *Histone acetyltransferases*) che promuovono l'acetilazione e le istone-deacetilasi (HDACs, *Histone deacetylases*) che rimuovono i gruppi acetilici. Tau è in grado di auto-acetilarsi e sembra che questo faciliti la sua frammentazione e migliori la sua degradazione autofagica. Inoltre, l'acetilazione dei

residui Lys259, 290, 321 e 353 in soggetti sani sembra proteggere tau dall'aumentata fosforilazione e quindi dalla sua aggregazione; viceversa l'acetilazione degli stessi residui in soggetti AD sembra ridotta.

L'acetilazione di tau può neutralizzare le cariche del MBD, interferendo con la sua capacità di legarsi ad essi e portando ad una disfunzione della proteina. In particolare, l'acetilazione sul residuo di Lys280 (situata nella regione ²⁷⁴VQIINKK₂₈₁) ha notevole importanza nella modulazione dell'interazione tra tau e i microtubuli, infatti potrebbe indebolirne il legame, generando un aumento di tau citoplasmatica che potrebbe portare all'aggregazione iniziale in PHFs (Kolarova et al., 2012). L'acetilazione ha anche mostrato di avere impatto sulla funzione sinaptica e sulla destabilizzazione del segmento iniziale degli assoni, che separa il soma e i dendriti dall'assone (Sohn et al., 2016). Tutti questi risultati suggeriscono che un aumento dell'acetilazione di tau destabilizza il citoscheletro con conseguente dislocazione della proteina nel compartimento somatodendritico. Tutto ciò ha portato a chiedersi come si innesca l'acetilazione anormale e come influisce sulla funzione sinaptica e sullo sviluppo delle tauopatie. In effetti, l'acetilazione-deacetilazione della lisina è stata proposta come una possibile modifica coinvolta nell'AD e altre malattie neurodegenerative. Dunque, l'acetilazione, sulla funzione di tau può o meno essere dannosa, a seconda dei residui bersaglio (Guo et al., 2017).

Altre modifiche post-traduzionali

Oltre alla fosforilazione e all'acetilazione, la proteina tau è soggetta ad altre modificazioni post-traduzionali, come N-glicosilazione, O-GlcNAcylation, glicosilazione, isomerizzazione, nitratura, l'ubiquitinazione, SUMOilazione, e metilazione. Anche se fino ad ora i ruoli esatti di queste rimangono poco chiari, l'importanza di ciascuna modifica durante il processo patologico di tau non può essere trascurata.

La glicosilazione ed in particolare l'N-glicosilazione sembra essere coinvolta nella fosforilazione di tau, sopprimendo la defosforilazione e molto probabilmente influenzando la conformazione della stessa. Pare che la proteina tau contenga circa 11 siti putativi di glicosilazione. L'O-glicosilazione invece è stata riscontrata a livello della proteina tau normale ed è stato descritto un tipo particolare di O-glicosilazione di tau, ossia l'O-GlcNAcylation (attacco di N-acetil-glucosamina su residui di serina o treonina) e sebbene il

significato funzionale non sia chiaro, sembra essere analoga alla fosforilazione. Ci sono dati che suggeriscono che aiuta a mantenere l'associazione di tau con i microtubuli impedendo l'iperfosforilazione e l'aggregazione in NFTs; è dunque un processo fisiologico che probabilmente aiuta a mantenere la proteina nel suo stato funzionale (Avila et al., 2004; Tapia-Rojas et al., 2019).

Modificazioni come glicazione e prolil-isomerizzazione, sono state rilevate a livello della proteina tau di soggetti con AD ma non in soggetti sani; probabilmente queste modifiche possono facilitare l'aggregazione di tau, alterando potenzialmente la sua conformazione. La glicazione ad esempio avviene su 12 siti diversi, 7 dei quali situati nel MBD e previene la degradazione promuovendo la polimerizzazione, la stabilizzazione degli aggregati, l'accumulo e la morte delle cellule neuronali (Martin et al., 2011). La prolil-isomerizzazione invece agisce sulla proteina tau, mediante la peptidil prolil-isomerasi Pin1, ed in particolare si verifica solo sulla p-Thr231, ma visto che in soggetti AD Pin 1 non è funzionante può facilitare l'iperfosforilazione, l'aggregazione e quindi tauopatie (Koralowa et al., 2012).

Tau può essere nitrata *in vitro* ma vi sono evidenze anche *in vivo*, in particolare in condizioni patologiche come l'AD. *In vitro* i siti di nitrurazione di tau sono quattro: Tyr18, Tyr29, Tyr197 e Tyr394, pare che la nitrurazione su Tyr29 o Tyr197 aumenti la formazione di aggregati filamentosi di tau, mentre su Tyr18 o Tyr394 la diminuisce. In particolare, alcuni studi hanno rivelato che, in cervelli AD, la nitrurazione sul residuo Tyr197 è presente sia a livello di tau solubile che di tau insolubile; questo suggerisce che la nitrurazione su Tyr197 può avere normali funzioni biologiche, ma può anche contribuire allo sviluppo di aggregati tau come i PHFs (Reynolds et al., 2005).

In condizioni fisiologiche tau viene ubiquitilata sul residuo di Lys48 portando così alla sua degradazione proteosomica, mentre in condizioni patologiche è ubiquitilata sui residui Lys254, Lys257, Lys311 e Lys317 localizzati sul MBD, quindi è probabile che tau viene anormalmente fosforilata, accumulata in PHFs e successivamente ubiquitilata al C-terminale (Rape, 2017).

La SUMOilazione è una modifica che può influire sulle interazioni proteina-proteina, sulla localizzazione subcellulare e sulla stabilità delle proteine. Tau può essere sumoilata su residui di Lys340 *in vitro* da SUMO1 e questo si correla con l'aumento della fosforilazione e riduzione dell'ubiquitilazione, suggerendo che tale modifica sia un evento patologico che

potenzialmente previene la degradazione di tau e ne promuove l'aggregazione (Luo et al., 2014).

Infine, è stata recentemente descritta la metilazione su residui di arginina e lisina. In condizioni fisiologiche, rappresenta la modifica che protegge dall'aggregazione, in condizioni patologiche sembra ridurre la capacità di tau di legare e stabilizzare i microtubuli e potenzialmente anche modulare l'aggregazione di tau (Funk et al., 2014; Guo et al., 2017).

Localizzazione neuronale di tau e suoi ruoli fisiologici

Nonostante tau sia una proteina prevalentemente citosolica, distribuita all'interno del compartimento somatodendritico ma predominante negli assoni, attualmente essa è considerata una proteina multifunzionale localizzata in diversi compartimenti subcellulari (fig. 8).

La funzione principale della proteina tau è quella di legare i microtubuli e stabilizzarli (fig. 8). Le interazioni tra tau e microtubuli possono essere sia dirette che indirette; attraverso i suoi MBDs è in grado di legare sia la tubulina polimerizzata che quella non polimerizzata, di conseguenza questa interazione, modulata dallo stato di fosforilazione di tau, guida l'assemblaggio della tubulina ai microtubuli e dunque insieme definiscono la morfologia neuronale (Butner and Kirschner, 1991; Kolarova et al., 2012). Infatti, uno studio recente condotto da Kellogg e collaboratori, ha dimostrato che il residuo Ser262, importante sito di fosforilazione, è coinvolto nel legame con la tubulina in un'interfaccia di polimerizzazione. La posizione di questo residuo indica chiaramente perché la sua fosforilazione gioca un ruolo fondamentale nella regolazione della capacità di tau di legare e stabilizzare i microtubuli (Kellogg et al., 2018).

La proteina tau è stata identificata anche a livello delle membrane plasmatiche neuronali (fig. 8), dove interagisce con esse mediante il suo dominio N-terminale e pare che venga reclutata dalla proteina chinasi fyn. Il ruolo di tau associato alle membrane non è ben chiaro ma sembra contribuire allo sviluppo dei neuriti e sembra essere necessario per indirizzare tau sulla superficie cellulare consentendole così di prendere parte a pathway di segnalazione intracellulari. Il legame di tau alle membrane è regolato dal suo stato di fosforilazione, precisamente la sua associazione ad esse si ha quando si trova in uno stato defosforilato; la fosforilazione infatti, sembra abolire questa interazione a seguito di cambiamenti conformazionali della stessa proteina e di alterazioni nel legame con altre proteine di membrana quali fyn (Guo et al., 2017).

In condizioni fisiologiche tau si trova localizzata, anche se in quantità relativamente basse, nei dendriti, comprese le spine dendritiche, dove il suo ruolo non è ben compreso (fig. 8). Tuttavia, l'interazione di tau con fyn potrebbe essere cruciale per indirizzare tale chinasi a livello delle spine dendritiche e quindi regolare la via di segnalazione mediata dal recettore NMDA (*N-methyl-d-aspartate*) attivato da fyn (Tapia-Rojas et al., 2019). Inoltre,

uno studio recente ha dimostrato che tau regola la plasticità sinaptica dei neuroni ippocampali e pare sia coinvolto nella maturazione morfologica e sinaptica dei neuroni granulari neoformati dell'ippocampo (Pallas-Bazarra et al., 2016).

È noto che a livello dei neuroni avviene il trasporto di organelli, vescicole ecc. dal soma agli assoni o/e dendriti e viceversa, per mantenere uno stato funzionale normale (fig. 8). Questo trasporto avviene, come detto in precedenza, attraverso la chinesina (direzione anterograda) e la dineina (direzione retrograda). Alte concentrazioni di tau a livello assonale hanno effetti diversi sulla funzione di queste due proteine: la dineina tende a invertire la sua direzione, la chinesina, invece si distacca. In particolare, alterazioni nel dominio di attivazione delle fosfatasi (PAD, *Phosphatase-Activating Domain*), dovute alla formazione di filamenti di tau, forme tronche o iperfosforilazioni della stessa, determinano l'inibizione del trasporto assonale anterogrado (Dixit et al., 2008). Un ulteriore dato interessante è emerso da studi condotti su colture neuronali primarie di topo, in cui cambiamenti anomali di tau, sembrano ridurre il trasporto assonale dei mitocondri, necessario in condizioni fisiologiche per la corretta funzione sinaptica, in quanto la motilità mitocondriale nei siti presinaptici favorisce il rilascio delle vescicole sinaptiche (Pooler et al., 2014). La up-regulation di tau normale o la fosforilazione anomala di essa, influenzano dunque negativamente il trasporto assonale di organelli inclusi i mitocondri.

Tau è presente anche a livello del citoscheletro dove interagisce direttamente con la spectrina e i filamenti di actina, mediante il suo MBD e aiutato dal dominio ricco in proline (He et al., 2009), e questo può stabilizzare i microtubuli e facilitare l'interazione con i neurofilamenti per limitare il movimento dei microtubuli (fig. 8). Ruolo meno noto a livello del citoscheletro è quello di fungere da *scaffold* tra i microtubuli ed altri componenti assonali grazie al fatto che interagisce con proteine della membrana plasmatica mediante il suo dominio N-terminale (Morris et al., 2011).

Ulteriore localizzazione della proteina tau, osservata più recentemente e di notevole importanza, è quella nucleare (Loomis et al., 1990). I neuroni richiedono meccanismi efficienti per proteggere l'integrità del DNA e dell'RNA per garantirne la funzionalità e la longevità. Pare che tau contribuisca a questa funzione in quanto può interagire con il DNA *in vitro* e *in vivo* e si trova all'interno del nucleo (fig. 8) (Violet et al., 2014; Camero et al., 2014). Saggi *in vitro* hanno dimostrato che tau si lega preferenzialmente alle regioni del

DNA ricco di AT, ed anche a doppi e singoli filamenti di DNA, interazioni che dipendono dall'aggregazione e dallo stato di fosforilazione di tau; tau aggregata o fosforilata non sarebbe più in grado di legare il DNA (Sultan et al., 2011).

Nel nucleo, tau sembra colocalizzi con le regioni degli organizzatori nucleolari (NORs, *Nucleolus Organiser Regions*) dei cromosomi acrocentrici contenenti rDNA (Brady et al., 1995; Sjöberg et al., 2006). Nei fibroblasti umani, linfoblasti e cellule HeLa, la tau nucleolare è stata localizzata nella periferia interna dei nucleoli, indicando che potrebbe avere un ruolo nell'assemblaggio nucleolare e nell'eterocromatizzazione dei geni ribosomali (Sjöberg et al., 2006; Mansuroglu et al., 2016).

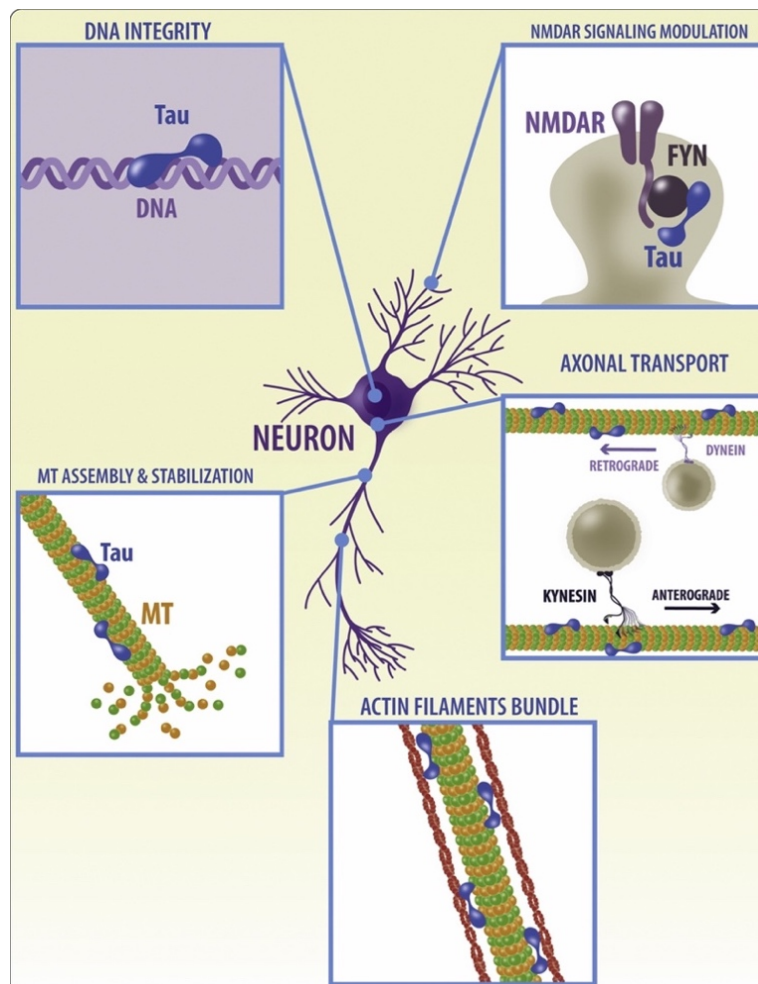


Figura 8: Funzioni fisiologiche di tau. I molteplici ruoli funzionali di tau: regolazione del trasporto assonale; interazioni con l'actina del citoscheletro facilitando la formazione di filamenti di actina; assemblaggio e stabilizzazione dei microtubuli; funzioni nucleari di protezione dell'integrità del DNA; regolazione della via di segnalazione mediata del recettore NMDA attraverso interazioni con fyn (Tapia-Rojas et al., 2019).

Il ruolo di tau nella malattia di Alzheimer

Nella malattia di Alzheimer, il ruolo fisiologico svolto dalla proteina tau nei neuroni è inefficace per mantenere ben organizzato il citoscheletro assonale in quanto perde la capacità di legarsi ai microtubuli. Questo comportamento anomalo è dovuto a cambiamenti conformazionali e misfolding nella normale struttura della proteina che portano alla sua aberrante aggregazione in strutture fibrillari all'interno dei neuroni di individui affetti, pertanto, la maggior parte della proteina tau anomala viene ridistribuita e aggregata sia nel compartimento somatodendritico che negli assoni dei neuroni colpiti (Hyman et al., 2005). In quest'ultimo caso, l'aumento della concentrazione intracellulare di tau, può inibire il trasporto lungo i microtubuli da parte delle chinesine e divenire dominante il trasporto effettuato dalle dineine; questo determina un rallentamento dell'esocitosi e influenza la distribuzione dei mitocondri che si ammassano vicino al centro di organizzazione dei microtubuli (MTOC, *Microtubule Organizing Center*). L'assenza di mitocondri e del reticolo endoplasmatico nelle regioni periferiche assonali potrebbe dunque determinare una diminuzione del metabolismo di glucosio e lipidi, della sintesi di ATP, dell'omeostasi del Ca^{2+} , che portano ad un processo di degenerazione distale degli assoni. Inoltre, la proteina tau fosforilata ha affinità con la chinesina e quindi viene trasportata nei siti distali del neuropilo e questo potrebbe spiegare il perché la formazione dei grovigli neurofibrillari nell'AD sembra iniziare in modo distale e diffondere in modo retrogrado al soma della cellula nervosa. Questo processo potrebbe dunque essere un meccanismo di protezione della stabilità dei microtubuli trasportando tau iperfosforilata più rapidamente in altre posizioni cellulari dove può formare aggregati (Mandelkow et al., 2003; Koralowa et al., 2012).

Da sempre i NFTs sono considerati indicatori di morte neuronale, quale però sia la tau più tossica tra la forma aggregata fibrillare e quella solubile iperfosforilata e se la tossicità rappresenta un guadagno o una perdita di funzione, ancora rimane non chiaro. Ad oggi la mancanza di prove dirette sulla tossicità della forma aggregata, rende sempre più avvalorabile l'ipotesi che siano le forme solubili oligomeriche di tau le più tossiche per la funzione neuronale e sinaptica e che i NFTs potrebbe effettivamente avere funzione protettiva nei confronti di essi (Šimić et al., 2016).

I meccanismi con cui la proteina tau diviene non funzionale non sono chiari ma l'ipotesi più accreditata è sicuramente quella di modifiche post-traduzionali anomale che determinano cambiamenti sia conformazionali che funzionali della proteina con conseguente perdita delle normali funzioni di tau. Prove convincenti del fatto che il malfunzionamento della proteina tau o la sola deregolazione di essa possano essere sufficienti a causare la morte neuronale, hanno portato ad affermare che le anomalie citoscheletriche sono un meccanismo base della neurodegenerazione nell' Alzheimer. Più precisamente, l'iperfosforilazione, l'aggregazione e la proteolisi della proteina tau in uno stadio neurofibrillare degenerativo definito "*pre-tangles*", è stato documentato neuropatologicamente come un evento precoce e cruciale della malattia di Alzheimer (Šimić et al., 2016).

Iperfosforilazione della proteina tau

I NFTs sono una caratteristica diagnostica della malattia di Alzheimer, la cui densità cerebrale è direttamente correlata alla progressione della malattia. Un importante progresso del XX secolo nel campo dell'AD è stata la scoperta che la proteina tau associata ai microtubuli è iperfosforilata e in questo stato alterato è la principale subunità proteica dei filamenti elicoidali appaiati (PHFs) che formano i grovigli neurofibrillari (NFTs). L'anomala iperfosforilazione, che avviene prima della comparsa nei NFTs, converte la proteina tau in proteina che distrugge l'assemblaggio dei microtubuli e, in questa forma, da una parte sequestra sia la tau normale che altre MAPs come MAP1 e MAP2 causando la rottura dei microtubuli, dall'altra promuove il misfolding della proteina normale e co-aggrega con essa nei filamenti (Wang et al., 2012).

Tau è una fosfoproteina e nel cervello normale contiene 2-3 moli di fosfato per mole di proteina, mentre tau iperfosforilata mostra un aumento di 2-3 volte il numero di moli di fosfato (Köpke et al., 1993) dovuto alla comparsa di nuovi siti fosforilati e all'attività alterata di proteine chinasi e fosfatasi che agiscono su essi; questo aumento della fosforilazione porta alla degenerazione neuronale innescata dall'assemblaggio di tau in grovigli composti da PHFs e SFs (*Straight Filaments*), riscontrati in AD. Pertanto, l'iperfosforilazione gioca un ruolo critico nell'aggregazione di tau e contribuisce alla patogenesi dell'AD, le cause però sono ancora oggetto di studio.

Come già detto, l'isoforma della proteina tau da 441aa, contiene 80 siti potenzialmente fosforilabili in AD di cui 39 residui di Ser e Thr e 2 di Tyr sono fosforilati nei PHFs (fig. 9) (Luna-Muñoz et al., 2007). Le chinasi coinvolte nell'iperfosforilazione sono molte, ma in particolare GSK-3 β , cdk5 e PKA fosforilano molti dei siti AD noti; GSK-3 β ad esempio ha come bersaglio più di 40 di questi siti con almeno 29 identificati in cervelli AD, pertanto, hanno attirato particolare attenzione per studi riguardanti l'attenuazione dell'iperfosforilazione usandoli come possibili bersagli terapeutici (Guo et al., 2017). Inoltre, GSK-3 β può fosforilare tau sui residui Ser199, Thr231, Ser396, Ser400, Ser404 e Ser413 *in vivo* e *in vitro*, siti che sono per lo più fosforilati nei PHF-tau (Koralova et al., 2012). È oggi noto che, diverse chinasi lavorano in modo coordinato tra loro, ad esempio la pre-fosforilazione da parte di PKA *in vitro*, promuove in modo significativo la successiva fosforilazione di tau da parte della GSK-3 β in siti di fosforilazione multipli. Inoltre,

un'attivazione transitoria di PKA potrebbe indurre un'iperfosforilazione di tau sia nei siti d'azione della proteina chinasi, sia in alcuni dei siti non-PKA, suggerendo che una stimolazione transitoria di PKA nelle fasi iniziali dell'AD, potrebbe giocare un ruolo nelle prime fasi della patologia (Wang et al., 2012). È stato dimostrato inoltre che, i livelli delle fosfatasi nei cervelli AD diminuiscono e ciò determina l'incapacità da parte dei neuroni di eliminare i gruppi fosfato; in particolare PP2A è la fosfatasi più attiva nella defosforilazione di tau iperfosforilata, con un'attività di circa il 70% rispetto a tutte le fosfatasi presenti, ma in AD questa percentuale risulta notevolmente diminuita (Gong et al., 1995).

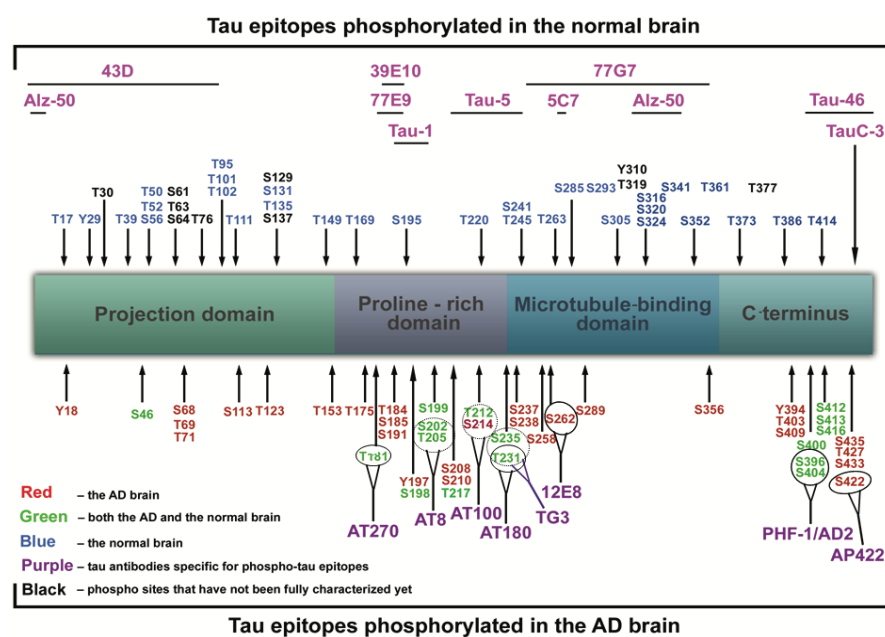


Figura 9. Epitopi tau fosforilati in cervelli normali e in AD. Nella parte superiore dello schema in blu i potenziali siti fosforilati presenti nei cervelli normali, in nero invece quelli non ancora completamente caratterizzati. Nella parte inferiore in rosso i siti fosforilati nei cervelli AD, in verde i siti fosforilati presenti sia in cervelli AD che normali. In viola gli anticorpi specifici per i corrispondenti epitopi fosforilati (Šimić et al., 2016).

A livello cellulare l'iperfosforilazione della proteina tau precede e promuove la sua auto-aggregazione in PHFs e introduce alterazioni in diversi processi cellulari che sono direttamente regolati dalla corretta organizzazione della rete microtubulare. Inoltre, pare che l'iperfosforilazione determini anche il distacco della tau ancora normale dai microtubuli, infatti più del 40% di tau iperfosforilata nei cervelli AD è presente nel citoplasma come proteina oligomerica e non polimerizzata in PHFs o in NFTs; questo porterebbe a misfolding e co-aggregazione in filamenti (Köpke et al., 1993). L'associazione intermolecolare di tau che porta all'auto-assemblaggio, sembra avvenire attraverso il MBD, mentre le regioni fiancheggianti possono inibire queste interazioni in quanto presentano

una grande concentrazione di residui carichi positivamente. Supportando questa idea, la fosforilazione di tau, che introduce cariche negative in questa regione, si tradurrebbe in molecole di tau che acquisiscono la capacità di legare tau normale e le interazioni tau-tau, iniziano a formarsi quando ci sono circa 4 moli di fosfato per mole di proteina; la polimerizzazione di tau che porta alla formazione di fibrille insolubili invece inizia quando ci sono circa 10 moli di fosfato per mole di proteina (von Bergen et al., 2000; Alonso et al., 2001, 2004; Koralowa et al., 2012). Da questi risultati si comprende che ci sono almeno due stati conformazionali di tau indotti dalla fosforilazione differenziale (fig. 10). Risultati simili sono stati osservati a seguito dell'ossidazione di tau in condizioni di stress ossidativo, in cui l'aggiunta di carbonili sui residui di Lys cambiano le cariche positive in negative pertanto, l'eliminazione del frammento positivo può indurre l'autoassemblaggio di tau (Zhou et al., 2018).

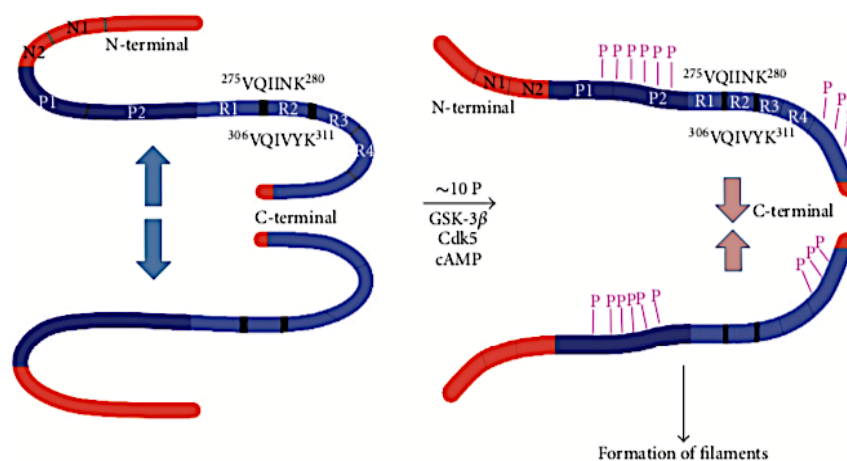


Figura 10. Iperfosforilazione della proteina tau. Tau si auto-assembla principalmente attraverso i domini di legame ai microtubuli, attraverso R3 nelle proteine 3R tau e R3 e R2 nelle proteine tau 4R (R2 (275VQIINK²⁸⁰) e R3 (306VQIVYK³¹¹)) hanno struttura β). Le regioni N-terminale e C-terminale alle ripetizioni sono inibite. L'iperfosforilazione di tau neutralizza questi domini inibitori di base, consentendo l'interazione tau-tau (siti di fosforilazione P indicati in viola) (modificata da Alonso et al., 2018).

La tossicità della proteina tau iperfosforilata è stata per anni discussa e generalmente è stato accettato che giochi un ruolo cruciale nella degenerazione neurofibrillare. Sono emerse però delle controversie in merito a questo negli anni: alcuni risultati hanno mostrato che l'aggregazione di tau è tossica per le cellule, altri che non lo è ma che possa essere un meccanismo di difesa mediante il quale i neuroni cercano di ridurre l'attività tossica di tau anormalmente iperfosforilata (Wang et al., 2012; Iqbal et al., 2015). Tutti i vari studi sono in accordo con i risultati del meeting europeo su tau tenutosi nel 2017 in cui

si evince che nelle tauopatie tau presente negli aggregati è sempre iperfosforilata (Mudher et al., 2017).

Un ulteriore dato interessante è che vi sono poche prove sulla morte cellulare apoptotica nei neuroni AD e questo implica che un certo meccanismo può portare i neuroni a sfuggire all'apoptosi. Molto probabilmente è l'iperfosforilazione ad inibire il pathway apoptotico; è stato dimostrato che le cellule con tau defosforilata sono più vulnerabili all'apoptosi, mentre l'iperfosforilazione può portare i neuroni ad un processo di "aborto" dell'apoptosi, questo fa sì che, il cervello non perda rapidamente molte cellule, anche se i neuroni sono comunque "malati" e non più in grado di svolgere le normali funzioni fisiologiche (Chun and Johnson, 2007). Inoltre, pare che i neuroni che presentano i NFTs sopravvivono anche per decenni, come visto nella regione CA1 dell'ippocampo. L'iperfosforilazione dunque porta ad una degenerazione retrograda lenta ma progressiva dei neuroni.

Processo di aggregazione di tau

Sebbene l'esatto meccanismo alla base dell'aggregazione di tau sia non chiaro, sembra che tau aggregata sia iperfosforilata e che l'iperfosforilazione sia un fenomeno che precede l'aggregazione e dunque è stata suggerita come possibile processo che porta all'aggregazione (Wang and Mandelkow, 2016).

La struttura nativamente non ripiegata di tau, presenta fisiologicamente una scarsa tendenza all'aggregazione e come già detto, numerosi studi hanno confermato che la caratteristica struttura "*paper clip*", tipica della tau libera nel citoplasma, potrebbe impedire l'aggregazione, ma una volta persa a causa ad esempio dell'iperfosforilazione, potrebbe rendere i domini N-terminali, C-terminali e di legame ai microtubuli neutralizzabili e quindi propensi all'autoassemblaggio in PHFs/SFs (Janegathen et al., 2008). Il processo di aggregazione di tau risulta dunque essere essenziale per la tossicità tau-indotta e per ridurre i livelli di tau funzionale solubile, sequestrare altri componenti cellulari e quindi ostacolare il trasporto assonale portando alla neurodegenerazione.

Il processo di aggregazione può essere descritto come segue (fig. 11): l'iperfosforilazione della proteina tau, comporta il cambio conformazionale e il misfolding della proteina, la quale non è più in grado di legare la tubulina, né di conseguenza promuovere l'assemblaggio dei microtubuli che si destabilizzano, per cui essa si auto-

aggrega in PHFs inizialmente e successivamente questi si associano portando alla formazione dei NFTs. Più precisamente, tau nella sua forma iperfosforilata, subisce dei cambi conformazionali che sono mediati dalla presenza, nel dominio di legame ai microtubuli, dei due motivi esapeptidici situati nelle ripetizioni R3 ed R2 ($_{306}\text{VQIVKY}_{311}$ e $_{274}\text{VQIINK}_{281}$ rispettivamente) con un aumento di strutture β -sheet che la conducono alla formazione di monomeri, seguita dalla formazione di dimeri. La dimerizzazione può avvenire attraverso interazioni tra i due motivi esapeptidici della R3, i due motivi esapeptidici della R2 o tra un motivo esapeptidico di R3 e uno di R2 e viceversa. Questi dimeri, raggiunta una concentrazione critica, vanno incontro ad oligomerizzazione e nucleazione formando gli oligomeri di tau (von Bergen et al., 2005; Mukrasch et al., 2009). Infine, gli oligomeri si allungano in protomeri tau che adottano una struttura trasversale tipica degli aggregati amiloidei e questi a loro volta si uniscono a formare i PHFs che alla fine portano alla formazione dei NFTs (Meraz-Ríos et al., 2010; Guo et al., 2017; Alonso et al., 2018).

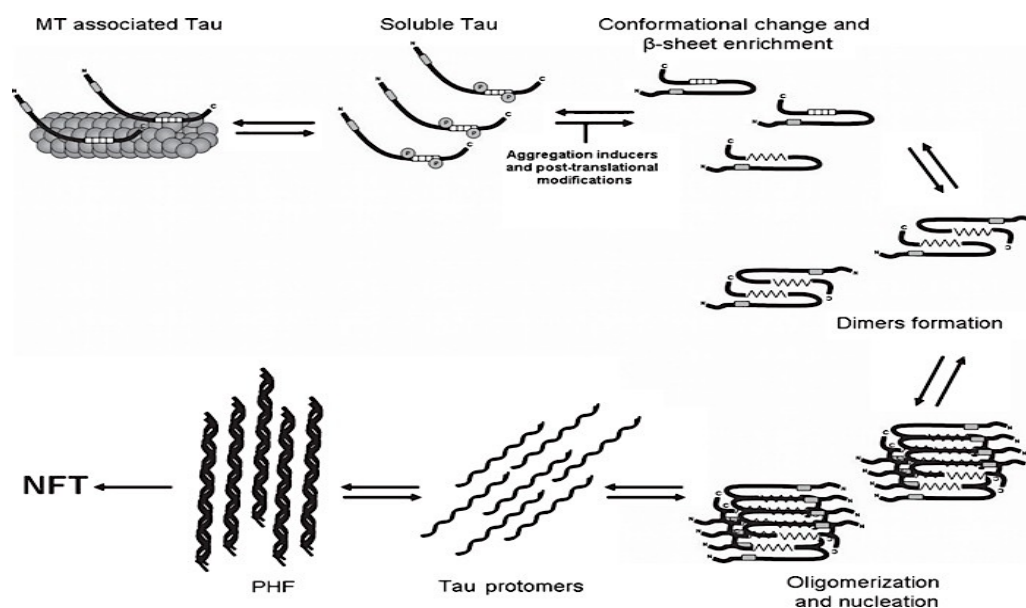


Figura 11. Aggregazione di tau. Rappresentazione schematica dell'aggregazione di tau e della formazione di NFTs (Meraz-Ríos et al., 2010).

A causa della presenza del motivo esapeptidico $_{274}\text{VQIINK}_{281}$ presente nella R2, codificata dall'esone 10, le isoforme 4R di tau sono più soggette all'aggregazione delle isoforme 3R.

Inoltre, mutazioni all'interno di tale motivo, che aumentano la propensione a formare β -sheet, come la mutazione P301L, promuovono l'aggregazione (Lewis et al., 2000).

Numerosi studi stanno supportando l'idea che l'aggregazione di tau sia strettamente associata alla citotossicità; probabilmente sono le forme oligomeriche solubili di tau, prodotte durante la formazione dei grovigli, ad essere dannosi per i neuroni e per la funzione sinaptica (Lasagna-Reeves et al., 2012; Cowan and Mudher, 2013). Questi oligomeri infatti, sono stati ritrovati nei tessuti cerebrali con AD e il loro livello mostra una relazione con il grado di deficit della memoria, anche se il loro ruolo rimane ancora non chiaro. Si presume che la diffusione patologica degli oligomeri tau attraverso i neuroni avvenga mediante endocitosi e via trans-sinaptica; una volta propagati nei neuroni post-sinaptici, l'oligomerizzazione innesca l'aggregazione e ciò avviene prima della formazione dei NFTs e per il momento questo modello di propagazione è il più accettato (Liu et al., 2012; Fa et al., 2016; Gao et al., 2018).

Oltre all' iperfosforilazione, il troncamento e una delle modifiche importanti che recentemente sono state associate al processo di aggregazione di tau e viene definito come la scissione proteolitica di tau che conduce ad un'aberrante aggregazione. Dunque, questo potrebbe essere il meccanismo che modifica la proteina in modo tale da renderla incline al misfolding e quindi adottare una conformazione anomala ed assemblarsi in filamenti piu facilmente (Derisbourg et al., 2015).

Il nucleo dei PHF, chiamato "*core PHF*", e costituito da frammenti di tau da 12 e 9,5 KDa contenente soltanto la regione MTBR che termina con il residuo Glu391 e pare che le forme tronche prive della coda C-terminale si assemblano piu velocemente e in misura maggiore e sembrano essere correlate con il deterioramento cognitivo dell'AD. Nel cervello AD, la caspasi 3 pare coinvolta nella scissione proteolitica di tau sul residuo di acido aspartico 421 (D421) *in vitro*; tau tronca in D421 si aggrega piu rapidamente di tau a lunghezza intera. Oltre al C-terminale anche l'N- terminale di tau risulta essere scisso su D13 e D402 dalla caspasi 6 nel cervello AD (Derisbourg et al., 2015), ma il significato patologico non e chiaro. Tutti questi risultati insieme suggeriscono che tau tronca gioca un ruolo critico nell'aggregazione, in quanto puo portare alla polimerizzazione e successiva formazione di PHFs insolubili di tau (Chong et al., 2018).

Tau nucleare e nucleolare nella malattia di Alzheimer

Per quasi quattro decenni le ricerche sulla proteina tau si sono concentrate in particolar modo sul suo ruolo nei microtubuli, anche se da tre decenni è noto che tale proteina sia localizzata anche a livello nucleare e in particolare nucleolare. Questa localizzazione ha ovviamente destato particolare interesse vista l'importanza di tali compartimenti su tutte le funzioni cellulari.

I risultati ottenuti dai numerosi studi, suggeriscono che tau nucleare possa essere essenziale per la difesa della stabilità genomica contro il malfunzionamento cellulare. Inoltre, la sua traslocazione nel nucleo, la sua conformazione nucleare, l'interazione con il DNA e altre proteine nucleari, suggeriscono altri potenziali ruoli nel nucleo.

È necessario comprendere quali siano i vari ruoli funzionali della proteina tau nei compartimenti in cui è localizzata, identificare se specifiche isoforme possano consentire di predire la sua diversa localizzazione cellulare e dunque la conseguente funzione e come queste possano essere coinvolte nella neurodegenerazione e nello specifico nella malattia di Alzheimer.

Localizzazione nucleare di tau

La presenza di PHFs a livello nucleare nei neuroni di soggetti affetti da AD è stata dimostrata per la prima volta nel 1988 e, nello stesso periodo, veniva dimostrata la localizzazione nucleare di tau non fosforilato in cellule di neuroblastoma umano, in particolare, a livello delle NORs dei cromosomi acrocentrici di cellule in divisione e nelle regioni fibrillari del nucleolo di cellule in interfase (Metuzals et al., 1988; Loomis et al., 1990). Inoltre, è stato dimostrato che anche cellule non neuronali come linfociti o fibroblasti presentano tau localizzata a livello nucleolare (Thurston et al., 1996) e che in cellule di non primati come linee cellulari cerebrali di ratto, neuroni corticali di cervelli di topo, tau è stata rilevata a livello nucleare.

Inizialmente, considerando che tau è stata trovata nel nucleolo prevalentemente di cellule in divisione, si era ipotizzato che la sua espressione in questo sito nucleare cessasse dopo il differenziamento, ma in seguito è stata identificata a livello nucleolare anche in cellule terminalmente differenziate e pertanto si è concluso che tau è una proteina anche nucleolare (Wang et al., 1993; Jämsä et al., 2004). Non è ancora chiara la funzione della proteina nel nucleo e questo diviene complicato per la presenza di diverse isoforme della proteina. Probabilmente, esistono specifiche isoforme nucleari e/o tau nucleare è generata da una trascrizione distinta; la proteina presente a livello dei microtubuli è diversa da quella presente nel nucleolo e questo oggi è chiarito (Wang et al., 1993; Andreadis, 2005). Il trascritto da 2 Kb di tau infatti, produce principalmente tau nucleare, con una piccola quantità di tau citosolica ma con funzione non-microtubulare; successivamente è emerso che i prodotti della trascrizione di tau da 6 Kb possono anche localizzarsi in piccole quantità a livello nucleare (Liu and Götz, 2013). Sarebbe dunque interessante chiarire la localizzazione delle numerose isoforme di tau e quali di esse siano a localizzazione nucleare.

È stato anche dimostrato che tau nucleare può esistere sia nello stato fosforilato che nativo e che probabilmente non è fosforilato all'interno del nucleo stesso ma nel citoplasma, per poi essere traslocato successivamente (Greenwood and Johnson, 1995; Frost et al., 2014). Altri studi hanno confermato, in linee cellulari normali di cervelli di topo e umani, che una certa quantità di tau nucleare potrebbe esistere in uno stato fosforilato (Lu et al., 2014b). Anche per quanto riguarda la tau fosforilata presente nel nucleo non è

chiaro quale sia il suo ruolo funzionale, ma pare che il compartimento nucleare potrebbe ospitare sia tau anomala che tau che sta andando incontro a trasformazione verso lo stato patologico (Bukar-Maina et al., 2016). Tutti i risultati ottenuti in questi anni di ricerche suggeriscono un ruolo per tau all'interno del nucleo in condizioni normali e patologiche. È dunque fondamentale capire come tau nucleare interagisca con il DNA e lo influenzi e se e come questo sia importante nelle patologie.

Interazione tau-DNA

Nel 1975 Bryan e collaboratori hanno dimostrato che l'RNA può inibire l'assemblaggio dei microtubuli *in vitro* per via della riduzione di attività della proteina tau; questo ha fornito la prima prova dell'interazione tra tau e l'RNA ed in effetti due decenni dopo è stato ulteriormente dimostrato che l'RNA può indurre l'aggregazione di tau in PHFs simili a quelli riscontrati in AD (Bryan et al., 1975; Kampers et al., 1996). Questa scoperta, vista la relazione tra RNA e DNA, ha suggerito da quel momento in poi anche una possibile interazione tra DNA e tau che ha portato a numerosi studi. Inizialmente si è scoperto che, proteine associate ai microtubuli nel cervello, legano il DNA con alta affinità e che il DNA, in maniera concentrazione dipendente, inibisce l'assemblaggio dei microtubuli indicando che queste proteine hanno una più alta affinità per il DNA che per i microtubuli (Corces et al., 1978; 1980). Studi successivi hanno dimostrato che tau è una proteina legante il DNA *in vitro* e che sia la proteina tau nativa che quella anormalmente fosforilata perdono la capacità di legare il DNA, pertanto è stato suggerito che tau iperfosforilata potrebbe perdere la capacità proteggere il DNA (Hua and He, 2000; Hua et al., 2003). Al fine di caratterizzare il legame tra tau e DNA, sono stati condotti studi sul legame tau-dsDNA e tau-ssDNA, dal quale è emerso che tau non solo lega il dsDNA ma anche il ssDNA in modo sequenza-specifica e che è anche in grado di indurre la denaturazione del dsDNA legandosi ad uno dei due filamenti in modo specifico; inoltre lega e piega il DNA attraverso il solco minore ricco in AT probabilmente tramite la regione del PRD e del MBD e che lega preferenzialmente sequenze da 13 bp o più (fig. 12) (Qu et al., 2004; Wei et al., 2008). Tuttavia, uno studio più recente del 2015, ha rivelato che questa interazione potrebbe avvenire a livello della seconda metà del PRD di tau e un secondo sito di interazione sul MBD a livello della ripetizione R2 e che tau interagisce probabilmente non solo con le

regioni ricche in AT ma anche con quelle ricche in GC, indicando un legame generale con la struttura del DNA, indipendentemente dalle basi, anche se è stato suggerito che l'idrofobicità è essenziale per l'interazione tau-DNA (Camero et al., 2014; Qi et al., 2015). In precedenza, è stato anche dimostrato che tau si lega alle sequenze α -satelliti di DNA umano, dunque, vi sono molte prove più che sufficienti che confermano la capacità di tau di interagire, legare e piegare il DNA ed è quindi necessario capire quale sia il suo ruolo funzionale a livello nucleare (Sjöberg et al., 2006).

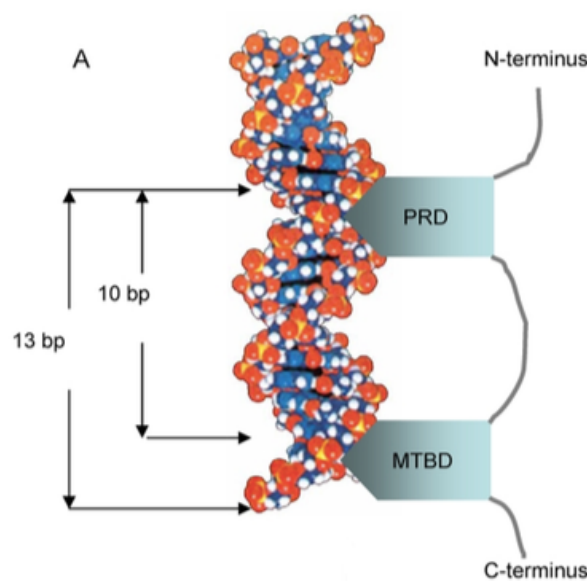


Figura 12. Modello dell'interazione tau-DNA. il PRD e il MBD possono legare il solco minore del DNA nello stesso piano. (Wei et al., 2008).

Ruolo funzionale di tau nucleare e nucleolare

Da quando è stata documentata la localizzazione nucleare di tau, è di particolare interesse comprendere in che modo essa interagisce con il genoma e se è in grado di influire sulle sue funzioni. La differente distribuzione di tau osservata a livello nucleare e nucleolare, sia nelle linee cellulari che nei neuroni di cervello umano, ha portato a distinguere il coinvolgimento di tau nella fisiologia e patologia neuronale tra le due localizzazioni.

La capacità di tau di interagire con gli acidi nucleici è considerata in relazione ad un suo possibile ruolo nella protezione del DNA; sembra infatti che protegga il dsDNA dalla denaturazione termica e dal danno indotto dai radicali liberi in modo dipendente dalla

concentrazione (Hua et al., 2003; Camero et al., 2014). Inoltre, la natura reversibile e dinamica di questa interazione, suggerisce un suo probabile ruolo simile ad una proteina heat-shock in quanto sembra agire in risposta ad uno shock termico, traslocando dal citoplasma al nucleo e al nucleolo per mantenere l'integrità del DNA nucleare e nucleolare e che tau nucleare sotto stress termico sembra essere defosforilato (Papasozomenos and Su, 1991; Sultan et al., 2011). Ancora, tau che trasloca tra citoplasma e nucleo sembra essere un'isoforma diversa rispetto a quella a prevalente localizzazione nucleolare delle cellule neuronali e non neuronali (Bukar-Maina et al., 2016). Ad oggi, il ruolo di protezione del DNA è l'unico ruolo funzionale nucleare che è stato chiaramente dimostrato sia *in vivo* che *in vitro* per tau (fig. 13).

Un altro probabile ruolo per tau è quello di proteina chaperon del DNA similmente ad HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*), chaperone che lega il solco minore del DNA in modo sequenza non specifica e piega il DNA inducendo la formazione di complessi multiproteici che facilitano la trascrizione. Studi precedenti hanno rivelato che le proteine leganti il solco minore del DNA possono srotolare il DNA e piegarlo in modo da regolare la trascrizione, d'altra parte però, possono alterare la conformazione del DNA negativamente e quindi potrebbero anche inibire la trascrizione (Carole et al., 1998). Pertanto, proteine leganti il solco minore del DNA, come tau, potrebbero sia avere funzione di attivatori trascrizionali che di inibitori, non possono essere regolatori trascrizionali diretti ma possono influenzare indirettamente la conformazione della cromatina e quindi alterare la trascrizione genica. Sulla base dei risultati sull'interazione tau-DNA, non è chiaro se la funzione primaria di tau sia quella di piegare il DNA per favorire la formazione dei complessi multiproteici o se piega il DNA solo come funzione di protezione; si potrebbe ipotizzare per tau anche un ruolo di attivatore trascrizionale a causa della sua capacità di indurre la separazione del dsDNA in ssDNA (Krylova et al., 2005). Tutte queste scoperte supportano l'idea di un ruolo di tau nella regolazione genica nucleare.

Estremamente interessante, considerando il ruolo del nucleolo nella vita cellulare, risulta la localizzazione di tau a livello nucleolare, in particolare nelle NORs delle cellule in divisione o a livello delle cellule in interfase; si localizza nella componente fibrillare densa e nei ribosomi pertanto, potrebbe svolgere un ruolo nell'assemblaggio o nella formazione nucleolare. Potrebbe anche essere coinvolto nella trascrizione dell'rDNA e/o nel

processamento dell'rRNA, nell'elaborazione dei ribosomi, dal nascente pre-RNA alla maturazione finale, ed inoltre potrebbe anche svolgere un ruolo nell'eterocromatinizzazione e nella stabilità dell'rDNA (Thurston et al., 1996, 1997; Carmo-Fonseca et al., 2000; Sjöberg et al., 2006; Mansuroglu et al., 2016) (fig. 14). Tau interagisce anche con l'eterocromatina perinucleolare e con il DNA α -satellite, ed è stato ipotizzato che possa fungere da collegamento tra le ripetizioni di rDNA e l'eterocromatina pericentromerica svolgendo un ruolo nel silenziamento dei geni per gli rRNAs (Grummt and Pickard, 2003; Sjöberg et al., 2006; Guetg et al., 2010). Infine, la sua associazione alle NORs dei cromosomi acrocentrici, suggerisce un potenziale ruolo nella stabilità cromosomica (Bukar-Maina et al., 2016) (fig. 13).

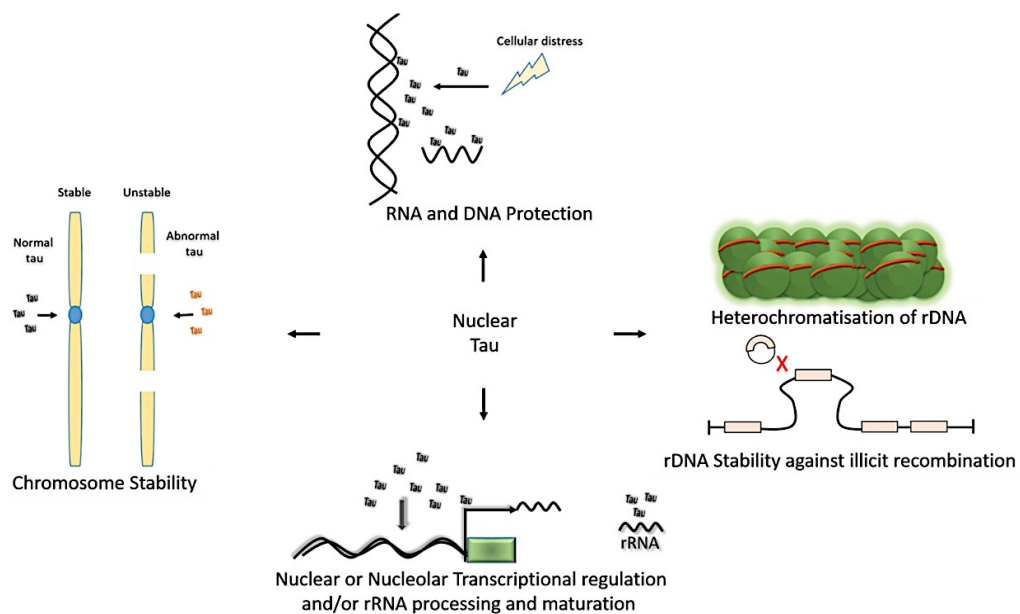


Figura 13. Potenziali ruoli di tau nucleare e nucleolare. Protezione del DNA e RNA da stress cellulare; eterocromatinizzazione e stabilità del rDNA, trascrizione dell'rDNA e/o processamento e maturazione del rRNA; possibile coinvolgimento nella regolazione trascrizionale nucleare o nucleolare; ruolo nella stabilità cromosomica (Bukar-Maina et al., 2016).

Ruolo della proteina tau nucleolare nell' AD

Numerosi studi sull'AD hanno riportato una riduzione delle NORs, della trascrizione dell'rDNA, una alterazione del macchinario che regola la biogenesi ribosomiale come UBTF (*Upstream Binding Transcription Factor*), Nucleolina (NLC) e Nucleofosmina (NMP1) in alcune regioni del cervello AD (Ding et al., 2006; Hernandez-Ortega et al., 2015). Come detto in precedenza, tau a localizzazione nucleolare è prevalentemente defosforilata, ma a

seguito della fosforilazione si dissocia dal DNA, pertanto, se tau è coinvolta nella biogenesi dell'rRNA, l'iperfosforilazione potrebbe dissociarla dai nucleoli e comportare un'alterata sintesi proteica, come osservato nella malattia di Alzheimer (Lu et al., 2013). Ma se tau nucleolare è potenzialmente coinvolta nell'eterocromatinizzazione dell'rDNA, essa potrebbe rimanere ancora più associata al nucleolo e portare alla riduzione della trascrizione dell'rDNA; in effetti è stato riscontrato che l'rDNA diviene ipermetilato in malattie come MCI (*Mild Cognitive Impairment*) e Alzheimer (Pietrzak et al., 2011). Le due ipotesi riportate quindi sono in contrasto tra loro pertanto sono necessari ulteriori studi per comprendere meglio il ruolo di tau nella biogenesi ribosomiale.

Il coinvolgimento di tau nucleare nella neurodegenerazione sembra essere dovuto all'iperfosforilazione, la quale pare giochi un ruolo cruciale nell'induzione dello stress ossidativo, rotture del dsDNA, decondensazione dell'eterocromatina, deregolazione genica e rientro nel ciclo cellulare (Mondragón-Rodríguez et al., 2013; Frost et al., 2014). Uno studio riportato da Hernandez-Ortega e collaboratori sembra fornire un valido collegamento tra tau nucleare e la neurodegenerazione, in quanto si dimostra la riduzione di tau nucleare, con la progressione della malattia, nei neuroni della regione CA1 e nel giro dentato dell'ippocampo, nella corteccia entorinale e nella neocorteccia temporale. In particolare, risulta quasi scomparsa nei neuroni, delle stesse regioni cerebrali appena citate, che presentano NFTs negli stadi successivi della malattia. Questi cambiamenti risultano inoltre associati alla riduzione, con il progredire della malattia, di markers della cromatina coinvolti nella metilazione degli istoni e nella acetilazione. Questo dimostra che le modifiche a cui va incontro tau causano la progressiva riduzione di tau nucleare ancora prima della formazione dei NFTs e che queste sono associate a modificazione della cromatina. Dunque, nella malattia di Alzheimer, il legame protettivo tau-DNA o la stabilizzazione dell'eterocromatina potrebbero essere alterati a causa del cambiamento anomalo di tau causato dall'iperfosforilazione.

Il nucleolo

Il nucleolo è un compartimento subnucleare non membranoso all'interno dell'architettura 3D non casuale del genoma, osservato citologicamente per la prima volta più di 200 anni fa, ma solo un secolo dopo si scopre che è associato a loci cromosomici specifici definendolo come entità citogenetica. Isolato per la prima volta negli anni '50 da ovociti di stelle marine (Vincent, 1952), fu negli anni '60 che si scoprì che il nucleolo è il sito di biosintesi dei ribosomi.

Questa scoperta ha riposizionato il nucleolo nello scenario scientifico, destando nei ricercatori notevole interesse e portando dunque a numerosi studi e successive scoperte, che lo definiscono oggi un organulo plurifunzionale, contenente un numero di proteine ed RNA con un ruolo fondamentale in diversi processi cellulari, pertanto un'alterazione della sua funzionalità può avere effetti importanti su diverse funzioni cellulari (Pederson, 2011; Parlato and Kreiner, 2013).

Il nucleolo è considerato un organulo intranucleare altamente dinamico, presente in tutti gli eucarioti, che si disassembla all'inizio del processo mitotico, si riassembla alla fine, ed è funzionalmente attivo in interfase (Hernandez-Verdun, 2011; Takada and Kurisaky, 2015).

Sebbene il nucleolo sia generalmente associato alla biogenesi del ribosoma, i numerosi studi effettuati su di esso confermano anche un suo coinvolgimento in molti altri processi cellulari, quali la regolazione della mitosi, progressione e blocco del ciclo cellulare, risposta allo stress cellulare e biogenesi di particelle ribonucleoproteiche multiple, inoltre studi recenti lo pongono in relazione con l'invecchiamento e la regolazione della funzione e della sopravvivenza neuronale nelle malattie neurodegenerative (Boisvert et al., 2007; Parlato and Kreiner, 2013).

Morfologia nucleolare

L'ultrastruttura del nucleolo in interfase mostra una "architettura tripartita" comprendente i centri fibrillari (FC, *fibrillar center*), la componente fibrillare densa (DFC, *dense fibrillar component*) e la componente granulare (GC, *granular component*). Oltre questi tre componenti, si evidenzia alla periferia nucleolare l'eterocromatina perinucleolare (PNH, *perinucleolar heterochromatin*) intervallata da eucromatina (fig. 14); dalla PNH, sottili filamenti di cromatina condensata entrano nel corpo nucleolare e prendono il nome di cromatina intranucleolare. Studi condotti sulla correlazione del rDNA con i componenti nucleolari hanno portato quindi a definire che:

- Le FCs contengono le sequenze di rDNA non trascritte e un pool di fattori di trascrizione dell'RNA Pol I non attivati, come UBTF e altri.
- Nella DFC si verifica il processamento iniziale del pre-rRNA ed è presente la fibrillarina, considerata un marker specifico della DFC, coinvolta nel processamento e nella modificazione del pre-rRNA.
- Nelle GCs avviene il processamento finale del pre-rRNA e l'assemblaggio delle subunità ribosomiali. Le proteine considerate markers specifici di questa componente sono la Nucleofosmina, coinvolta nella biogenesi dei ribosomi, e Nop52 coinvolta nella fase finale del processamento del pre-rRNA.

Molti dubbi si hanno sull'esatto compartimento nucleolare dove avviene la trascrizione dell'rDNA ma si è trovati un consenso nel posizionare come probabile sito di trascrizione dell'rDNA l'interfaccia tra FCs e DFC (Mangan et al., 2017; Pickard and Bierback, 2013; Schöfer and Weipoltshammer, 2018).

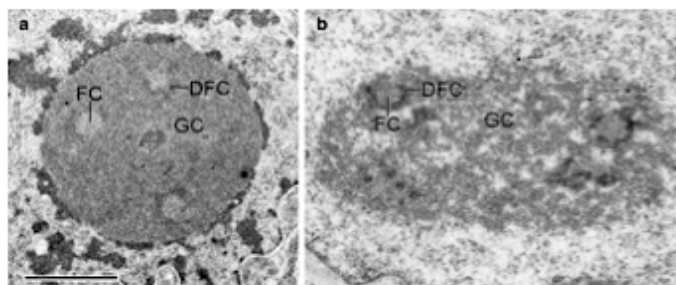


Figura 14. Nucleoli al microscopio elettronico. a) Nucleolo compatto con PNH abbondante; b) nucleolo contenente poca PNH, ma abbondante cromatina intranucleolare. FC: centro fibrillare, DFC: componente fibrillare densa, GC: componente granulare; bar 1 μm per entrambe le immagini (Schöfer and Weipoltshammer, 2018).

Dinamiche nucleolari durante il ciclo cellulare

La notevole dinamicità dei nucleoli comporta sue variazioni durante le varie fasi di ogni ciclo cellulare (fig. 15). Durante la metafase la trascrizione dell'rDNA da parte del macchinario di trascrizione della RNA Pol I viene interrotta e si assiste al disassemblaggio del nucleolo con le NORs attive osservabili come *gaps* acromatici, sui cromosomi acrocentrici in metafase (McStay, 2016). UBTF, proteina specifica nucleolare, si lega per tutto il ciclo cellulare alle ripetizioni di rDNA e dunque in metafase la ritroviamo associata, fungendo così da marcatore mitotico e sito di legame per il macchinario della Pol I (O'Sullivan et al., 2002). Durante la metafase le NORs reclutano una serie di proteine nucleolari, tra cui fattori di attivazione della trascrizione come SL1 (*selective factor 1*) ed RRN3 (*RNA polymerase I-specific transcription initiation factor RRN3*), i quali formeranno i cosiddetti corpi prenucleolari (PNBs), strutture dinamiche in cui si concentreranno i complessi proteici necessari per il processamento (Mangan et al., 2017).

La trascrizione dell'rDNA riprende nella telofase/G₁ iniziale, ed è associata con l'assemblaggio dei nucleoli, i quali si riformano attorno alle singole NORs formando piccoli nucleoli multipli ed UBTF è richiesto per la loro riformazione. Durante l'inizio della fase S, Pol I viene rilasciata transitoriamente dall'rDNA per prevenire la collisione con il macchinario replicativo, mentre nella parte centrale di questa fase le FCs e DFCs vengono ripristinate. Durante la progressione della fase G₁, FC, DFC e GC si dispongono attorno alle unità di trascrizione attive e avviene la cosiddetta fusione nucleolare con conseguente formazione di grandi nucleoli maturi contenenti NORs multiple attive (fase G₂) (Hernandez-Verdun, 2011; Nemeth and Grummt, 2018).

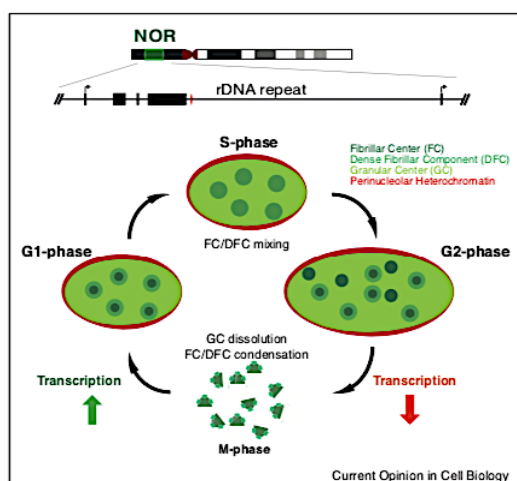


Figura 15. Dinamica nucleolare dipendente dal ciclo cellulare. Sopra, l'ideogramma di un cromosoma acrocentrico umano con evidenza sulla NOR ed ingrandimento su una ripetizione di rDNA. Sotto, rappresentazione dei cambiamenti caratteristici dell'architettura nucleolare nelle diverse fasi del ciclo cellulare (Nemeth and Grummt, 2018).

L'architettura nucleolare osservata in interfase, dipende dallo stato trascrizionale della cellula. Trattando linee cellulari con basse concentrazioni di Act-D (*Actinomycin D*), un agente intercalante del DNA con specificità per l'rDNA ricco in GC che inibisce l'attività trascrizionale della Pol I, si osserva una rapida riorganizzazione della struttura nucleolare con conseguente formazione di caps sulla superficie nucleolare contenenti la FC, alcune proteine della DFC e l'rDNA, mentre la GC rimane nella parte interna del nucleolo (Latonen, 2019). Una riorganizzazione simile è stata osservata anche in risposta a rotture della doppia elica nelle sequenze di rDNA (fig. 16) (Warmerdam et al., 2016; van Sluis and McStay, 2017). Inoltre, l'osservazione che l'Act-D induce la formazione di caps nucleolari immediatamente adiacenti ad una singola DJ, sequenze distali di circa 400 Kb fiancheggianti le ripetizioni di rDNA localizzate nella PNH, suggerisce che queste possano fungere da ancore per le ripetizioni di rDNA trascrizionalmente attive e ciò fa pensare ad un ruolo nella formazione e/o nel funzionamento dei nucleoli (Floutsakou et al., 2013; van Sluis and McStay, 2017; Tchelidze et al., 2017) (fig. 16).

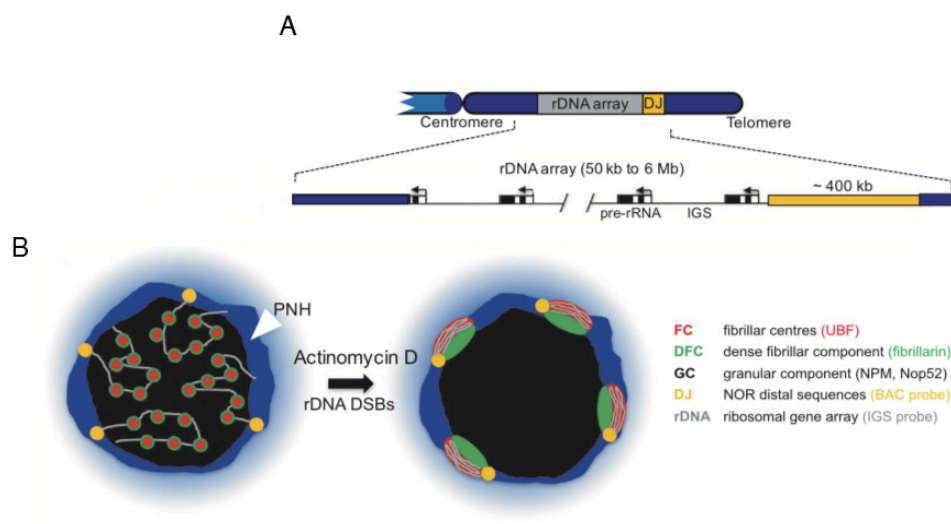


Figura 16. Sequenza DJ ed organizzazione delle NORs in un normale nucleolo e sotto stress. A) Rappresentazione della ripetizione di rDNA umano in cui è evidenziata in giallo la sequenza DJ di ~400 Kb, condivisa da tutti i cromosomi acrocentrici. B) Organizzazione delle NORs (linea grigia) e DJ (cerchio in giallo) in un normale nucleolo maturo e dopo esposizione ad AMD o DSBs del rDNA (Mangan et al., 2017).

Il DNA ribosomiale e le NORs

Il nucleolo si forma alla fine della mitosi, attorno alle ripetizioni in tandem trascrizionalmente attive di rDNA che costituiscono le NORs. Alla periferia dei nucleoli, vi sono le ripetizioni di rDNA trascrizionalmente inattive e queste potrebbero anche trovarsi nella cromatina intranucleolare come parte di un loop che fuoriesce dalla PHN e si dispone nella parte interna del nucleolo (Schöfer and Weipoltshammer, 2018).

Nel genoma umano, vi sono circa 400 copie di ripetizioni in tandem di rDNA localizzati nei cinque cromosomi acrocentrici 13, 14, 15, 21 e 22, la cui espressione è regolata sia attraverso fattori che rimodellano la cromatina sia mediante specifici eventi epigenetici e sono fiancheggiati dalle sequenze PJ (*Proximal Junction*) e DJ (*Distal Junction*) (Henderson et al., 1972; McStay, 2016).

Ogni unità di ripetizione (fig. 17) consiste di una *regione codificante* di circa 13 Kb, che produce un trascritto precursore, il pre-rRNA (indicato come 45S o 47S), che viene successivamente processato in tre rRNA maturi: 18S, 5.8S e 28S i quali vengono complessati con l'rRNA 5S e le proteine ribosomiali per formare le singole subunità ribosomiali che verranno trasportate nel citoplasma. È presente inoltre un IGS (*intergenic spacer*) di circa 31 KB. Ai confini di ciascuna unità trascrizionale vi sono le sequenze ETS (*External Transcribed Spacers*, 5'ETS e 3'ETS), mentre la parte codificante di ciascuno dei tre geni nella sequenza 45S è separata da sequenze ITS (*Internal Transcribed Spacers*, ITS1 e ITS2). Ogni unità di trascrizione dell'rDNA dei mammiferi è fiancheggiata da una o più sequenze di terminazione e sono inoltre presenti due promotori all'interno dell'unità ripetuta di rDNA: il *promotore del gene* e lo *spacer promoter*. La trascrizione del pre-rRNA 45S è controllata dal *promotore del gene* che consiste di due parti: un *core promoter* e un elemento di controllo a monte. Lo *spacer promoter*, situato all'interno dell'IGS, può dare origine all'RNA non codificante pRNA che si ritiene partecipi al silenziamento genico (Mckeown and Shaw, 2009; Santoro et al., 2010).

La trascrizione dei geni per gli rRNA richiede un macchinario di trascrizione specializzato: inizialmente si ha la formazione del complesso di pre-inizio (PIC), che comprende UBTF, RRN3, SL1 e il promotore dei geni rDNA attivi, in seguito ha inizio la trascrizione da parte della RNA Pol I, la quale porta alla produzione del pre-rRNA (Grummt 2013).

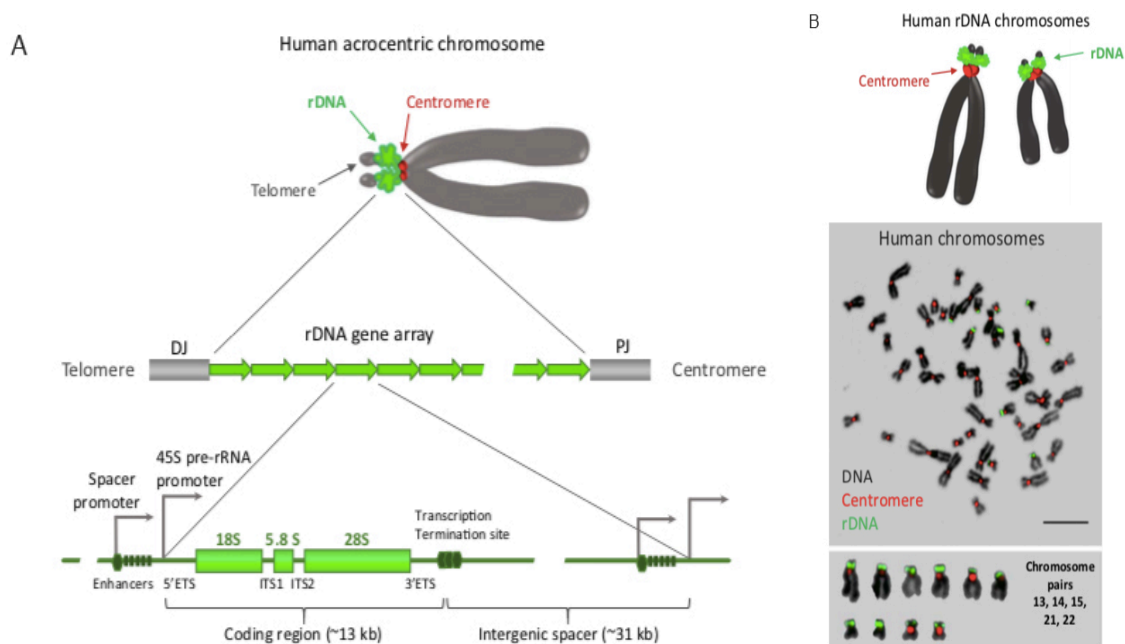


Figura 17. Rappresentazione schematica dei geni del rDNA umano e localizzazione. A) Le ripetizioni di rDNA fiancheggiate da PJ e DJ. L'unità di ripetizione con la regione codificante e uno spaziatore intergenico; i due promotori indicati con le frecce; ai lati della regione codificante le sequenze 5'ETS e 3'ETS, i tre geni separati dalle ITS1 e ITS2; i siti di terminazione a valle dell'unità di trascrizione. B) Localizzazione del rDNA nei cromosomi acrocentrici umani (verde) relativamente ai centromeri (rosso); il pannello mostra la localizzazione del rDNA nei cromosomi mediante FISH e i singoli cromosomi umani contenenti i loci di rDNA (Potapova and Gerton, 2019).

Organizzazione della cromatina dell'rDNA

Così come i territori cromosomici sono regioni del nucleo occupate da determinati cromosomi (Cremer and Cremer, 2010), si ipotizza che i nucleoli siano specifiche regioni nucleari occupate dai NORs con una organizzazione e architettura non casuale. È noto che il genoma delle cellule eucariotiche è compartimentalizzato e ciascun cromosoma in interfase risulta occupare una posizione non casuale ma associata a caratteristiche composizionali e funzionali quali: densità genica, timing di replicazione e livelli di espressione (Federico et al., 2008). Più recentemente, un approccio biochimico ha consentito di rilevare che la cromatina risulta organizzata in domini topologicamente associati (TAD, *topologically associating domain*). La formazione dei TADs è stata spiegata dal modello "DNA loop extrusion", in cui i loops di DNA vengono estrusi attraverso il lume formato da complessi proteici SMC (*Structural Maintenance of chromosomes*) ad anello, vincolati dalla proteina CTCF (*CCCTC-binding factor*) ed in questo modo, vengono riuniti elementi genomici distanti con conseguente compattazione della cromatina in cromosomi. L'analisi Hi-C ha inoltre

confermato la compartimentalizzazione del genoma pervenendo ad un livello di risoluzione superiore, in cui tratti di cromatina tendono ad associarsi tra loro in compartimenti attivi "A" e inattivi "B" (Nuebler et al., 2018). Il nucleolo è spazialmente organizzato e separato dagli altri domini cromatinici e risulta distinto dai compartimenti A e B, dai quali è isolato grazie alla PNH. Data la sua compartimentalizzazione unica, al nucleolo potrebbe essere applicato il modello "*DNA loop extrusion*" dell'organizzazione genomica? Alcuni studi mediante tecnica 3C, in grado di rilevare le associazioni spaziali tra le diverse parti della stessa sequenza, hanno messo in evidenza delle interazioni tra il promotore e le sequenze terminatrici dei geni del rDNA, che possono essere interpretati come loop genici tra siti di inizio e di fine della trascrizione (Nemeth et al., 2008). Un altro studio invece, propone che le porzioni inattive dei geni vengono estruse tramite la formazione dei loop avvicinando così il sito di terminazione di un gene con quello di inizio dell'altro. Questa proposta sembra essere più in linea con l'osservazione che i TADs tendono ad essere nelle regioni altamente trascritte. Rimane comunque non chiaro se le associazioni topologiche tra diverse ripetizioni di rDNA co-localizzano nello stesso compartimento nucleolare (Potapova and Gerton, 2019).

Regolazione epigenetica della cromatina del rDNA

In tutte le cellule eucariotiche la RNA Pol I trascrive solo i geni per l'rRNA ma la sua attività di sintesi rappresenta più del 60% dell'intera attività trascrizionale di una cellula eucariotica. Pertanto, il sistema di trascrizione è finemente regolato per garantire che la sintesi di rRNA sia associata alle esigenze di crescita delle cellule (Goodfellow and Zomerdijk, 2013).

Le NORs contengono centinaia di geni per gli rRNA la maggior parte dei quali sono attivi e l'rDNA presenta una cromatina estremamente decondensata; le NORs inattive, invece, si presentano come foci condensati di rDNA localizzati alla periferia nucleolare corrispondenti alle DJ e PJ, contenenti geni per gli rRNA stabilmente silenziati. Sembra che negli organismi con NORs multipli, ci siano meccanismi che portano al silenziamento di intere NORs, mantenendo così questo stato epigenetico per tutto il ciclo cellulare e propagandolo da una generazione di cellule a quella successiva, pertanto, il numero di NORs che partecipano alla trascrizione nucleolare è sotto controllo epigenetico (McStay and Grummt, 2008).

Il principale meccanismo epigenetico nelle cellule di mammifero è la metilazione del DNA che risulta essere correlata al silenziamento genico. Studi condotti con Psoralene, farmaco che si intercala nel DNA a doppio filamento, hanno rivelato che la metilazione nella regione del promotore dell'rDNA determina un aumento di copie di rDNA silenti (McStay and Grummt, 2008). La metilazione del DNA infatti, distingue i geni silenti dai geni attivi o inattivi. I geni silenti mostrano strutture eterocromatiche, si associano a markers di modificazioni istoniche repressive come H3K9me2, H3K9me3 e istone-deacetilasi, presentano cromatina ricca di nucleosomi e inoltre la presenza di metilazioni sul promotore impedisce il legame di UBTF. Le NORs contenenti geni attivi o inattivi invece, non presentano metilazioni, indicando che il loro stato trascrizionale può essere invertito e il fattore chiave in questo caso è UBTF: i geni attivi si associano con UBTF e sono privi di nucleosomi nella regione codificante, i geni inattivi non interagiscono con UBTF ed appartengono all'rDNA con cromatina ricca di nucleosomi come le NORs silenti. Pertanto, nei cromosomi in metafase, questi possono essere visualizzati dal legame persistente con UBTF, ma anche SL1 e TTF1 (fig. 18) (McStay and Grummt, 2008).

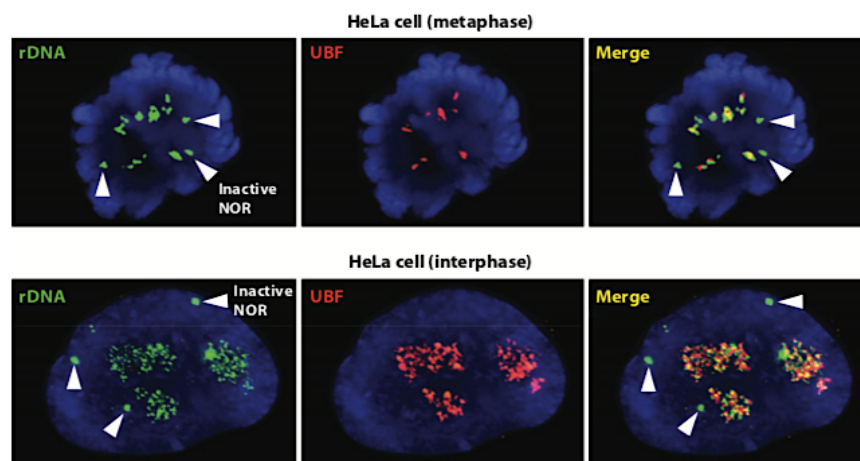


Figura 18. NORs silenti e attive durante il ciclo cellulare. Immagini di immuno-FISH su cellule HeLa in metafase (pannelli superiori) e interfase (pannelli inferiori) in cui viene mostrata la localizzazione del rDNA e UBTF. L'rDNA è visualizzato in verde e UBTF in rosso. Le NORs inattive, prive di UBTF, sono indicate dalle punte di freccia. Cromosomi e nuclei in blu (DAPI) (McStay and Grummt, 2008).

Uno dei fattori che permette di stabilire lo stato epigenetico dei geni per gli rRNA è TTF-I (*Transcription termination factor I*), proteina che si lega a specifici elementi terminatori a valle dell'unità di trascrizione dell'rDNA. TTF-I definisce la conformazione inattiva dell'rDNA attraverso la sua associazione con il complesso di rimodellamento della cromatina NoRC, il

quale sposta il nucleosoma, legato al promotore del sito di inizio della trascrizione, in una posizione sfavorevole per la formazione del complesso di trascrizione (Goodfellow and Zomerdijk, 2013; Grummt, 2013).

Un ulteriore ruolo importante nel controllo epigenetico dell'rDNA è dato dai trascritti IGS chiamati pRNAs (promotor-associated RNAs). I pRNAs hanno origine da un promotore intergenico della Pol I situato a circa 2 kb a monte del sito di inizio della trascrizione del pre-rRNA. Questi pRNAs sembrano stabilizzati attraverso il legame con NoRC e pare che l'associazione di quest'ultimo con l'rDNA è stabilizzata e la formazione di eterocromatina rinforzata (Mayer et al., 2006; Grummt, 2007).

Studi recenti iniziano ad indicare che i geni per gli rRNA silenti possono svolgere un ruolo importante nella struttura del nucleolo e nella stabilità genomica; è stato dimostrato che queste strutture eterocromatiche proteggono la stabilità sia dei geni nucleolari che di altre ripetizioni situate al di fuori dei nucleoli (Bersaglieri and Santoro, 2019).

Il nucleolo dunque rappresenta un esempio di come l'attività può controllare l'architettura e di come questa architettura a sua volta è finemente regolata per garantire la funzionalità nucleolare alquanto complessa, questo pertanto potrebbe far ipotizzare ad un sistema di "auto-organizzazione".

UBTF, un fattore di trascrizione nucleolare multifunzionale

UBTF (*Upstream Binding Transcription Factor*) è una delle principali proteine architetturali che definisce la struttura e l'attività dei geni del rDNA. Contiene un dominio di dimerizzazione, sei scatole HMGB coinvolte nel legame con l'rDNA e un dominio di attivazione trascrizionale. È stata inizialmente identificata come attivatore trascrizionale dell'espressione dell'rRNA e tale funzione è stata ampiamente caratterizzata. Inizialmente si sosteneva che l'unica funzione di UBTF fosse quella di formare il complesso di pre-inizio per attivare la trascrizione, oggi invece sappiamo che questa proteina svolge numerose funzioni. Si lega all'rDNA attraverso i domini HMG e recluta il resto del macchinario di trascrizione attraverso la regione C-terminale che media il reclutamento di SL1, necessario per la trascrizione mediata dalla Pol I (Moss et al., 2007; Ueshima et al., 2017). UBTF definisce i geni attivi del rDNA durante il ciclo cellulare e controlla il numero di geni del rDNA attivamente trascritti (Sanij and Hannan, 2009).

Numerosi esperimenti hanno dimostrato che il legame di UBTF con l'rDNA e la successiva trascrizione è sufficiente per la formazione del nucleolo; rimane legato infatti durante la mitosi quando la trascrizione viene sospesa, assicurando una rapida riformazione del nucleolo e un nuovo inizio della trascrizione nell'interfase successiva. Questo fornisce una spiegazione valida sul perché le NORs attive rimangono costituite da cromatina decondensata durante la mitosi (Grob and McStay, 2014). Studi recenti hanno portato alla dimostrazione che, il legame di UBTF all'rDNA introduce cambiamenti fisici nella struttura della cromatina: promuove il rimodellamento della cromatina, in particolare nella regione di codifica, in cui la presenza di UBTF mantiene tale regione, che si estende dal sito di legame di UBTF ai siti di terminazione TTF1, priva di nucleosomi (NFR, *Nucleosome Free Region*), formando una struttura che impedisce la riformazione dei nucleosomi in tutta la regione; è stato infatti dimostrato che l'assenza di UBTF porta alla rigenerazione dei nucleosomi (Moss et al., 2019). Tutti questi dati supportano l'idea che l'associazione diretta di UBTF con l'rDNA impedisce l'impacchettamento della cromatina. Poiché l'espressione di UBTF diminuisce durante il differenziamento, si può supporre che la modulazione di tale proteina sia un meccanismo per il silenziamento dell'rDNA durante lo sviluppo (Herdman et al., 2017).

Il nucleolo nelle malattie neurodegenerative

È noto che la disfunzione nucleolare determina cambiamenti cellulari e molecolari accompagnati da ridotta attività nucleolare e contribuisce alla patologia di numerosi disturbi genetici rari, come la sindrome di Werner, di Treacher Collins e predispone a determinate forme di cancro. Inoltre, è stato anche implicato nel sistema nervoso come causa di disturbi neurodegenerativi legati all'età, inclusa la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la malattia di Huntington e molti altri; durante l'invecchiamento, principale fattore di rischio per le malattie neurodegenerative, pare infatti che si verifichi un declino della sintesi di rRNA e delle dimensioni dei nucleoli. Tuttavia, il problema nell'identificazione dei meccanismi e dei fattori responsabili dell'insorgenza di questo tipo di patologie è che la maggior parte dei casi è sporadica e, anche quando è presente una base ereditaria, c'è una grande variabilità tra gli individui a conferma del carattere multifattoriale. Durante le prime fasi della malattia di Alzheimer ad esempio, potrebbe verificarsi il silenziamento dell'rDNA e questo potrebbe avere un ruolo nei deficit ribosomiali e infine portare alla demenza (Pietrzak et al., 2011). In linea con questa ipotesi, la metilazione differenziale dell'rDNA è stata proposta come meccanismo per ridurre l'espressione dei geni per gli rRNA nei pazienti con AD (Parlato and Kreiner, 2013).

Ulteriori studi hanno dimostrato che la variazione nel numero di copie del rDNA potrebbe creare uno squilibrio nel rapporto tra ripetizioni attive e silenti che a loro volta possono alterare il contenuto di eterocromatina. Questo potrebbe determinare un'alterazione dell'espressione genica e conseguente instabilità dell'rDNA, il quale potrebbe essere coinvolto nell'eziologia e progressione del cancro e nella neurodegenerazione, compresa la malattia di Alzheimer. È stata a tal proposito introdotta quella che viene definita "teoria del rDNA sull'invecchiamento", in cui si propone che l'invecchiamento dipendente dall'instabilità dell'rDNA induca la senescenza e prevenga l'instabilità del genoma globale. Inoltre, sono necessarie ripetizioni silenti di rDNA per la riparazione del danno al DNA, pertanto alterazioni a livello del rDNA con conseguente diminuzione o aumento delle copie hanno un grande impatto sui processi cellulari, tra cui la struttura e la funzione dell'eterocromatina, l'espressione genica globale e la risposta al danno del DNA. Questi processi possono quindi, a loro volta, promuovere l'invecchiamento, il cancro e le malattie neurodegenerative (Diesch et al., 2014; Bahadori et al., 2018).

La malattia di Alzheimer

Agli inizi del '900 Alois Alzheimer, psichiatra e neuropatologo tedesco, presentò uno studio clinico-patologico su una donna di 51 anni, Auguste Deter, che presentava una particolare forma di demenza precoce che l'aveva condotta alla morte dopo soli 5 anni di malattia caratterizzati da progressivi disturbi psichiatrici, perdita di memoria e problemi linguistici. Alzheimer correlò le caratteristiche cognitive e comportamentali della donna con i reperti isto-patologici post-mortem che mostravano una scarsità di neuroni della corteccia cerebrale con conseguente atrofia cerebrale e la presenza di due distinti tipi di lesioni cerebrali che egli chiamò *foci miliari* ed *inclusioni filamentose* considerati da quel momento in poi i segni caratteristici della malattia (Alzheimer, 1907); queste lesioni oggi vengono chiamate rispettivamente *placche senili* (A β) e *grovigli neurofibrillari* (NFTs) definiti gli elementi neuropatologici dell'Alzheimer (fig. 19).

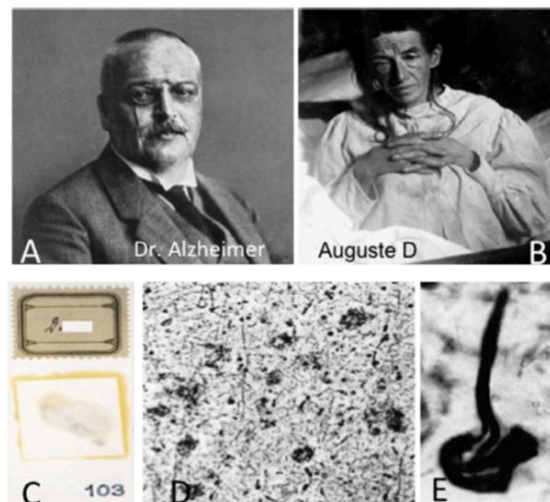


Figura 19. Alois Alzheimer e il suo primo caso studio. A) e B) immagini fotografiche di Alzheimer e la sua prima paziente Auguste Deter; C) Immagine delle diapositive e sezioni istologiche post-mortem originali che mostrano placche neuritiche impregnate d'argento (D) e un groviglio neurofibrillare (E) nel cervello di Auguste Deter (Mufson et al., 2015).

La malattia di Alzheimer (AD) è una malattia neurodegenerativa progressiva, irreversibile ed incurabile caratterizzata da deficit cognitivi e funzionali, nonché perdita di indipendenza funzionale e cambiamenti comportamentali. I sintomi cognitivi includono deficit della memoria a breve termine, in seguito di quella a lungo termine, afasia primaria progressiva, atrofia corticale posteriore e frontale sono invece le varianti rare e atipiche con relativa preservazione della memoria.

Rappresenta la più comune forma di demenza con il 60-70% di tutti i casi, i 2/3 di tutti i soggetti affetti donne e il principale fattore di rischio è sicuramente l'età, infatti, colpisce il 10% delle persone di età superiore ai 65 anni e circa il 50% delle persone di età superiore agli 85 anni. È possibile riscontrare casi di Alzheimer anche in individui molto giovani, a volte 20 anni, ma con molta probabilità questi sono dovuti a mutazioni geniche. Altri fattori di rischio sono l'esistenza di uno o più alleli E4 del gene dell'apolipoproteina (APOE4), la storia familiare dell'AD, le scarse abilità professionali ed educative, i fattori di rischio cardiovascolari e i traumi cerebrali moderati o gravi nella storia del paziente, pertanto, la malattia di Alzheimer viene definita una patologia multifattoriale.

Attualmente, tutti i casi di AD sono divisi in due gruppi. La prima forma, conosciuta anche come forma ereditaria "familiare" (FAD, *Familial Alzheimer's Disease*), si verifica in circa l'1-5% di tutti i casi diagnosticati come AD ed è caratterizzata da un esordio precoce (50 anni o prima) ed è associata a mutazioni nel gene della proteina precursore dell'amiloide (APP) e nei geni che codificano per PS1 o PS2 (preseniline 1 e 2) componenti del complesso della γ -secretasi. Al contrario, la seconda forma chiamata Alzheimer sporadica (SAD, *Sporadic Alzheimer's Disease*) o ad insorgenza tardiva (LOAD, *Late-onset Alzheimer's Disease*) è caratterizzata da un esordio tardivo (di solito dopo i 65 anni) e colpisce una percentuale significativa della popolazione; non è chiaramente associata a nessun profilo di mutazione distinto, sebbene esista una maggiore probabilità di malattia, ad esempio nei portatori dell'allele ApoE ϵ 4 (Kozlov et al., 2017).

Risulta essere ad oggi la 4° causa principale di morte nella popolazione ed il numero di persone in tutto il mondo affette da AD entro il 2050 è stimato intorno ai 131 milioni, con il numero più alto di persone colpite atteso nei paesi a reddito medio e basso.

La diagnosi medica dell'AD è molto difficile soprattutto nella fase iniziale in quanto i sintomi vengono ripetutamente confusi con le normali conseguenze dell'invecchiamento. Progredisce lentamente in 3 stadi clinici identificabili in lievi (precoci), moderati e gravi (finali), che esistono insieme ai normali processi di invecchiamento. Pertanto, l'AD è caratterizzata da un'insorgenza insidiosa in cui si manifestano uno stato di incoscienza e problemi di memoria a breve termine e nel corso della malattia si manifestano sintomi più gravi come perdita dell'orientamento, cambiamenti nella personalità e nel

comportamento, afasia grave con un linguaggio che diviene incomprensibile, disfunzioni motorie (Zvěřová, 2019).

La malattia di Alzheimer è riconosciuta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come una priorità di salute pubblica. Nonostante i grandi progressi sulla comprensione della patogenesi di questa importante malattia, non ci sono ancora trattamenti che modificano tale patologia e pertanto, non esiste una cura efficace in grado di ridurre la progressione che culmina inevitabilmente con la morte dell'individuo (Lane et al., 2018).

Neuropatologia dell'Alzheimer

I principali segni distintivi caratteristici della malattia di Alzheimer, che comportano un'importante perdita neuronale che a livello macroscopico si traduce in atrofia cerebrale, sono le *Placche Amiloidi* ($A\beta$, β -amyloid) ed i *Grovigli Neurofibrillari* (NFTs) (fig. 20). Si ritiene che questi elementi neuropatologici contribuiscano alla progressiva neurodegenerazione associata all'AD (Serrano-Pozo et al., 2011).

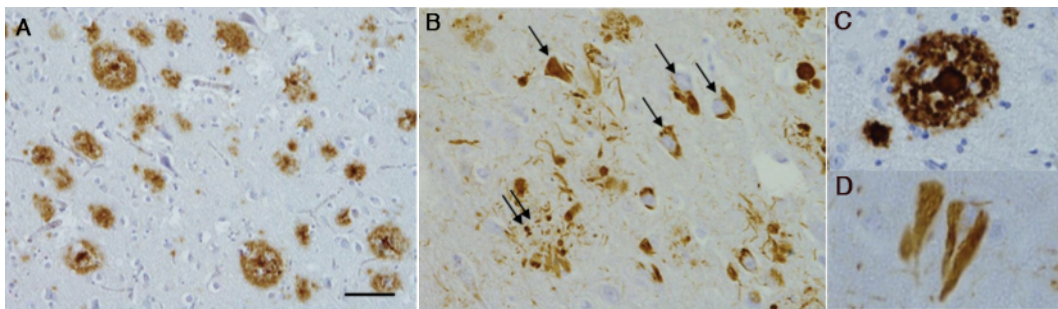


Figura 20. Elementi neuropatologici caratteristici della malattia di Alzheimer. A) Placche amiloidi presenti nella corteccia frontale; B) Analisi immunohistochemica in cui sono evidenti sia NFTs (singola freccia) sia placche neuritiche (doppia freccia); C) e D) Placca amiloide con un evidente nucleo centrale di $A\beta$ e NFTs a maggiore ingrandimento (modificata da: Lane et al., 2018).

Le prime sono depositi extracellulari del peptide $A\beta$ anormalmente ripiegato, che può essere costituito da 40 o 42 aminoacidi ($A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$) e che deriva dal metabolismo della APP. Si è ritenuto che l'accresciuta deposizione di $A\beta$ preceda e induca la formazione di NFT e questa cosiddetta "ipotesi della cascata amiloide" ha dominato il campo della ricerca sull'AD negli ultimi 25 anni. Il peptide $A\beta_{42}$ risulta essere il più abbondante all'interno delle placche amiloidi rispetto al peptide $A\beta_{40}$, a causa del suo più alto tasso di fibrillazione e insolubilità. Il peptide $A\beta$ può essere presente all'interno di questi depositi in aggregati insolubili (placche diffuse) che rappresentano le lesioni più precoci che si trovano in un cervello malato e in forme che includono fibrille e oligomeri (placche neuritiche) che rappresentano le lesioni riscontrate in cervelli in fase avanzata della malattia in cui sono anche presenti degenerazioni assonali e dendritiche. I depositi amiloidi non seguono uno schema di progressione cerebrale canonico, ma in linea di massima si sviluppano nell'isocortex e solo negli ultimi tempi sono state identificate nelle strutture subcorticali, mentre risultano presenti in misura minore, rispetto ai NFTs, nella corteccia entorinale e nell'ippocampo (Castellani et al., 2010; Serrano-Pozo et al., 2011).

I NFTs sono invece accumuli intraneuronali della proteina tau iperfosforilata, presenti nel soma dei neuroni piramidali. La distribuzione dei NFTs in realtà mostra una migliore correlazione con la perdita neuronale nel cervello dei pazienti con AD rispetto alle placche senili, suggerendo che la proteina tau patologica contribuisce direttamente alla neurodegenerazione associata ad AD e al deterioramento cognitivo. La distribuzione di questi accumuli neurofibrillari è molto omogenea, si sviluppano nella corteccia entorinale mediale, progrediscono verso l'area ippocampale e diffondono attraverso le aree isocorticali man mano che la malattia progredisce. Questo modello di progressione dei grovigli neurofibrillari costituisce le basi del sistema di stadiazione tradizionale di Braak che viene utilizzato per la diagnosi post-mortem dell'AD (Lane et al., 2018).

I grovigli neurofibrillari, NFTs

I grovigli neurofibrillari, sono stati descritti inizialmente da Alzheimer come “*neurofibrille* formanti dei fasci vicino la superficie cellulare dei neuroni colpiti”; questi non sono altro che i grovigli extracellulari presenti a seguito della morte neuronale, chiamati oggi “*ghost tangles*” (DeTure and Dickson, 2019). I NFTs presenti nel cervello di pazienti con Alzheimer sono composti da uguali quantità di isoforme tau 3R e 4R e appaiono strutturalmente come filamenti elicoidali appaiati (PHFs) e filamenti dritti (SF) (fig. 21).

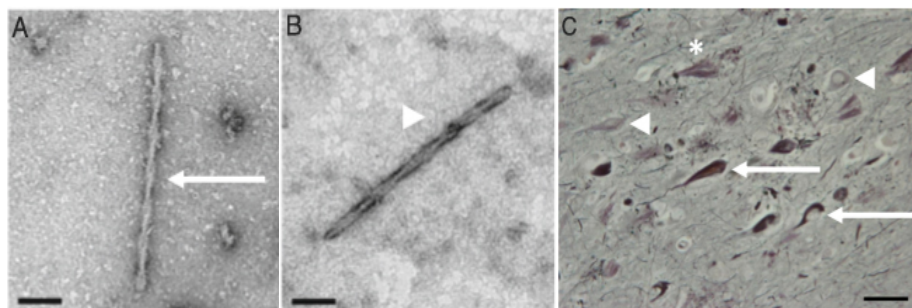


Figura 21. Componenti strutturali dei NFTs. A) Filamenti elicoidali appaiati (PHFs); B) Filamenti dritti (SF); C) Evidenti i pre-grovigli intracellulari (punte di freccia), grovigli neurofibrillari maturi (freccia) e “ghost tangles” extracellulari (asterisco) (modificata da: DeTure and Dickon, 2019).

Nel 1963 con l'aiuto della microscopia elettronica Kidd e Terry, separatamente, determinarono che i NFTs sono costituiti da 2 filamenti anomali che appaiono avvolti in maniera elicoidale, che Kidd chiama filamenti elicoidali appaiati (PHFs), di circa 15 nm (nel

punto più stretto) e 30 nm (nel punto più largo) di diametro, che formano coppie di filamenti con conformazione tridimensionale elicoidale aventi una periodicità regolare di 80 nm. Una piccola parte delle fibrille presenti all'interno dei NFTs invece sono presenti come dei filamenti dritti (SF) aventi un diametro di 15 nm (Kidd, 1963; Terry, 1963; Šimić et al., 2016).

A causa del fatto che i PHFs sono aggregati altamente insolubili, la composizione strutturale e molecolare rimase non chiara fino alla metà degli anni '80. Studi successivi condotti da Crowther e Wischik sono stati in grado di stabilire in maniera definitiva che il PHF è costituito da una doppia elica, contenente una subunità strutturale a forma di C orientata trasversalmente ognuna delle quali ha tre domini. La caratterizzazione della subunità strutturale del nucleo del PHF è risultata altrettanto complicata per via dell'alta insolubilità di questi aggregati, ma numerosi e successivi studi hanno dimostrato che la proteina tau è una delle proteine associate ai NFTs e che costituisce il nucleo strutturale del PHF (Crowther and Wischik, 1985; Wischik, 1985; Šimić et al., 2016).

Durante gli anni '90 comprendere il significato dei NFTs nelle malattie neurodegenerative ed in particolare nella malattia di Alzheimer, rimase in secondo piano in quanto "l'ipotesi della cascata amiloide" era la più accreditata e quindi studiata. Tuttavia, numerosi studi successivi dimostrarono che i NFTs si propagavano con un andamento spazio-temporale ben preciso e correlato con la progressione della malattia. Inizialmente mediante colorazione d'argento e successivamente mediante immunoistochimica, Braak e colleghi identificarono vari stadi neuropatologici, in cui i NFTs si depositavano in maniera graduale all'interno dei neuroni malati (Braak and Braak, 1991; Braak et al., 2006). Braak e Braak dunque proposero un modello topografico di progressione della neurodegenerazione causata dai depositi neurofibrillari che prevedeva sei stadi (fig. 22): inizialmente i NFTs diffondono dalla regione transentorinale alla formazione ippocampale (fasi iniziali I e II) e si correlano clinicamente con il deterioramento della memoria a breve termine e lieve disorientamento spaziale, ma con la conservazione del funzionamento cognitivo generale con o senza compromissione minima delle attività della vita quotidiana; quindi alla neocorteccia temporale, frontale e parietale (fasi intermedie III e IV), correlandosi infatti con difficoltà nel linguaggio, disorientamento, compromissione della concentrazione, comprensione e concettualizzazione oltre ad altri sintomi tipici della demenza; infine, ai

neuroni sensoriali primari, aree unimodali e aree motorie della neocorteccia (fasi tardive V e VI), che sono grossomodo associati a disturbi nel riconoscimento di oggetti, soggetti e altre abilità percettive e motorie (Braak and Braak, 1991). Oltre a dimostrare che la malattia di Alzheimer procede secondo fasi ben definite e che i NFTs evolvono partendo da un accumulo di tau anormale senza formazione di PHF, definita fase "pre-groviglio", Braak e collaboratori hanno anche proposto che il danno neuronale nell'AD inizia in realtà molti anni prima di qualsiasi sintomo clinico e che, diversamente dal peptide A β , la distribuzione dei NFTs è associata alla progressione clinica dell'AD. In contrasto con l'ipotesi della cascata amiloide, secondo cui la presenza dei grovigli è un fenomeno secondario, le scoperte neuropatologiche di Braak e collaboratori hanno alimentato una significativa controversia sull'importanza o il contributo del peptide A β nel produrre danno rispetto a quello causato dalla proteina tau anomala (Šimić et al., 2016).

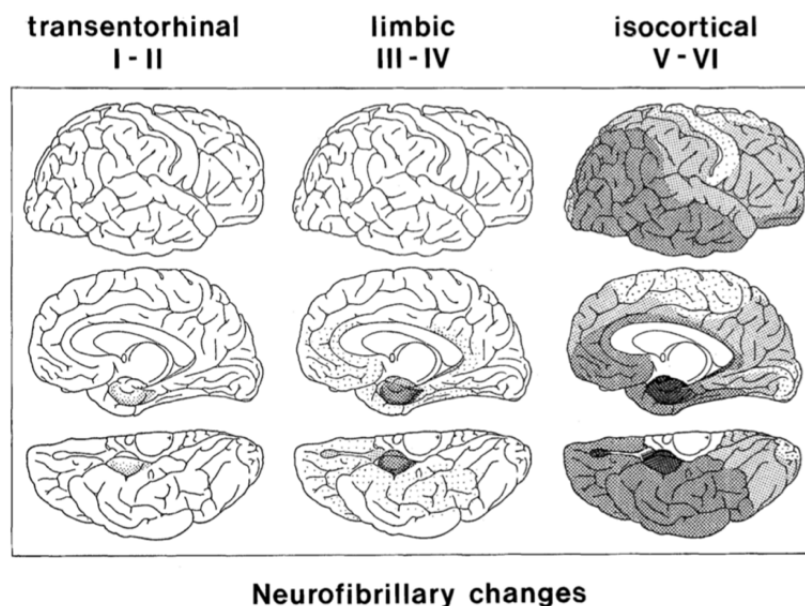


Figura 22. Modello di progressione della degenerazione neurofibrillare di Braak e Braak. Si possono distinguere sei stadi (I-VI): stadi I-II alterazioni limitate a un singolo strato della regione transentorinale; stadi III-IV grave coinvolgimento dello strato entorinale e transentorinale pre-ct; stadi V-VI distruzione isocorticale. L'aumento della densità delle sfumature indica l'aumento della gravità delle modifiche NF (Braak and Braak, 1991).

Ipotesi biologiche della malattia di Alzheimer

L'eziopatogenesi della malattia di Alzheimer non è ancora chiara, ma i dati fino ad oggi ottenuti suggeriscono che questa complessa patologia è più di una malattia neurodegenerativa del cervello.

Anche se il ruolo di tau iperfosforilata nell'AD è stato per decenni ritenuto secondario rispetto all'accumulo di A β , un crescente numero di evidenze suggerisce che tau ha ruoli unici nell'AD che sono indipendenti dal A β . Gli aggregati tau e misfolding di questa, compromettono il trasporto assonale, la funzione mitocondriale, la dinamica citoscheletrica e innalzano lo stress ossidativo nell'AD in modo indipendente dal A β (Wu et al., 2017).

Sono state proposte negli anni, sulla base degli importanti progressi scientifici, varie ipotesi che tentano di spiegare l'origine della malattia di Alzheimer, in particolare: *“Ipotesi della cascata amiloide”*, *“Ipotesi della propagazione tau”* e *“Ipotesi ciclo cellulare”*. La cosiddetta *“ipotesi della cascata amiloide”*, secondo cui l'accumulo e la deposizione del peptide β -amiloide oligomero o fibrillare è la principale causa della malattia di Alzheimer, è il concetto principale alla base della ricerca sull'AD. Studi recenti però sembrano far vacillare questa teoria, indicando invece come principale responsabile della malattia di Alzheimer la proteina tau iperfosforilata (Kametani and Hasegawa, 2018). Altrettanto recente è l'ipotesi *“ciclo cellulare”* in cui viene proposto che l'AD è causata dal rientro aberrante di diverse popolazioni neuronali nel ciclo di divisione cellulare (Zhu et al., 2007).

Ipotesi della *“cascata amiloide”*

L'ipotesi amiloide è stata la spiegazione principale della patogenesi dell'Alzheimer per oltre 25 anni. In condizioni normali il peptide A β viene escisso dalla proteina APP dalle β - e γ -secretasi e rilasciato all'esterno della cellula dove viene degradato. In condizioni patologiche o in soggetti anziani invece, la capacità metabolica di degradazione del peptide è ridotta e questo comporta il suo accumulo. Secondo questa teoria, l'aumento dei livelli di peptide A β induce la formazione di fibrille amiloidee che a loro volta accumulandosi portano alla formazione delle placche senili, causando neurotossicità e portando all'accumulo della proteina tau patologica e di conseguenza alla morte neuronale e alla neurodegenerazione (Hardy and Solkoe, 2002). Inoltre, mutazioni del gene *APP* raggruppati

vicino i siti di scissione delle secretasi, identificate in AD familiari ad insorgenza precoce, la duplicazione del locus APP in AD ad insorgenza precoce autosomica dominante ed infine mutazioni nelle preseniline 1/2 in AD familiare, comportano un aumento notevole dell'accumulo di A β e tutto questo sembrava sostenere l'ipotesi amiloide.

Studi condotti successivamente iniziarono a far emergere dubbi su quanto dimostrato fino a quel momento; esperimenti effettuati su modelli di topi modificati geneticamente, in cui si ha accumulo di A β nei loro cervelli, hanno mostrato che nonostante la presenza di placche senili, la formazione dei NFTs e la morte cellulare neuronale non veniva osservata e che il A β non è intrinsecamente citotossico. Da qui si sviluppa l'idea che siano gli oligomeri di A β ad essere i principali agenti tossici, in quanto mediante ulteriori studi su topi emerge che il A β , causa un deficit sinaptico, ed una diminuzione notevole delle spine dendritiche come osservato in AD. Nonostante però questi dati, non sono stati osservati degenerazione neuronale, perdita neuronale né danni alle funzioni cognitive, pertanto, sembra chiaro che il peptide A β (compresi oligomeri e fibrille amiloidi) non è citotossico e non porta all'accumulo di tau (Kim et al., 2013).

Studi condotti anche su pazienti affetti da Alzheimer hanno dimostrato che i depositi A β sono un fenomeno legato all'invecchiamento e non hanno una relazione diretta con l'insorgenza dell'AD; pertanto sembra che, la neurodegenerazione, la perdita neuronale e i depositi amiloidei siano fenomeni indipendenti tra loro e non correlati come sostenuto invece dall'ipotesi amiloide (Kametani and Hasegawa, 2018).

Ipotesi della “propagazione tau”

Nel 2009 viene introdotta l'ipotesi della “propagazione tau” (Frost et al., 2009), come potenziale meccanismo attraverso il quale la proteina tau patologica, considerata sostanza principale che causa la malattia di Alzheimer, può svilupparsi e progredire attraverso le varie regioni del cervello. Come precedentemente discusso, la diffusione dei NFTs in tutte le aree del cervello anatomicamente collegate, è fortemente correlata con la progressione clinica della malattia e si ipotizza che tau anomala sia quindi trasmessa da neurone a neurone e che i grovigli sono presenti prima dell'accumulo del peptide A β (Johnson et al., 2015; Lewis and Dickson, 2016).

Nell'ipotesi "propagazione tau" dunque, la proteina con una conformazione patologica, viene rilasciata dai neuroni che la contengono e si accumula nei neuroni collegati sinapticamente dove innesca la formazione dei NFTs. Questa ipotesi ha destato un interesse particolare sulla comunità scientifica portando a numerosi studi, in cui prove sperimentali *in vitro* e *in vivo* hanno supportato ulteriormente tale idea. Frost insieme ai suoi collaboratori, fu il primo a dimostrare *in vitro* la trasmissione diretta da cellula a cellula di tau, indicando che tau extracellulare aggiunta al terreno di coltura viene assorbita per endocitosi dalle cellule, all'interno del quale poi va incontro ad aggregazione (Frost et al., 2009). Un ulteriore gruppo di ricerca ha dimostrato, a seguito di microiniezioni di fibrille di tau esogene in cervelli di topo, la formazione di aggregati intraneuronali di tau nell'area di iniezione e nelle aree collegate anatomicamente (Clavaguera et al., 2009). La propagazione di tau *in vivo* è stata successivamente confermata mediante esperimenti su topi transgenici tau, in cui l'espressione della proteina tau umana era limitata alla corteccia entorinale, ma nel tempo, a seguito dello sviluppo della neuropatologia, risultava presente a livello dell'ippocampo in cui i neuroni ricevono robuste proiezioni assionali dalla corteccia entorinale. Questo ha fornito una prova diretta della propagazione di tau intraneuronale nei topi, anche se rimane da chiarire quale sia la tau patologica che viene trasferita per comprendere i meccanismi che controllano la propagazione nel cervello (de Calignon et al., 2012; Liu et al., 2012).

Nei soggetti affetti da AD, la proteina tau anomala esiste in più forme biochimicamente distinte; per questo motivo sono stati condotti altri studi che hanno dimostrato che è la forma oligomerica o fibrillare di tau a propagarsi nelle cellule e che si tratta di una tau ad alto peso molecolare fosforilata (Takeda et al., 2015; Wang and Mandelkow, 2016; Takeda, 2019). L'accumulo e il rilascio di essa sono regolati da meccanismi ancora sconosciuti, ma rimane sempre più evidente che i cambiamenti del peptide A β e di tau si verificano indipendentemente tra loro ma possono insieme aggravare la progressione neurodegenerativa.

Sulla base di questa interessante ipotesi, divenuta un tema innovativo e controverso, la proteina rappresenterebbe un possibile biomarcatore di diagnosi precoce dell'Alzheimer in quanto potrebbe essere un indicatore più accurato della progressione della malattia rispetto al peptide A β .

Ipotesi “ciclo cellulare”

Un numero elevato di studi indicano un ruolo predominante del ciclo cellulare alterato nella patogenesi dell'Alzheimer che pertanto potrebbe essere considerata come una malattia di deregolazione del ciclo cellulare dei neuroni (Zhu et al., 2007; Bonda et al., 2010).

I neuroni di ippocampo adulto normalmente si trovano in una fase del ciclo cellulare non divisoria, denominata G_0 ; raggiunta questa fase tali cellule diventano differenziate in via terminale e ciò significa che non sono più in grado di rientrare nel ciclo cellulare; tuttavia, è stato dimostrato che questo processo è alterato nei neuroni vulnerabili. Molti dati indicano che le cellule nervose in fase G_0 , nella malattia di Alzheimer sono erroneamente riattivate e quindi rientrano nel ciclo cellulare senza essere però in grado di completarlo; inoltre, non saranno in grado di andare incontro a mitosi (Moh et al., 2011). I neuroni AD esibiscono infatti livelli significativamente elevati di marcatori del ciclo cellulare rappresentativi di un rientro nel ciclo a partire da uno stato di quiescenza ed inoltre, sembra che esista una relazione diretta e indiretta tra stress ossidativo e alterazione del ciclo cellulare (McShea et al., 1997). Questi dati hanno creato la base per quella che viene definita ipotesi del ciclo cellulare, spiegata da un'ulteriore ipotesi detta a “due colpi”, secondo cui la neurodegenerazione nell'AD si sviluppa come conseguenza dello stress ossidativo e del ciclo cellulare alterato; l'effetto di questi due colpi indurrebbe un ciclo dannoso di stress ossidativo, infiammazione, aggregazione di $A\beta$ e tau, disfunzione mitotica e morte cellulare, tutti processi coinvolti nello sviluppo dell' AD (Zhu et al., 2007; Cubinkova et al., 2018).

L'ipotesi a 2-colpi, che porterebbe “all'immortalità” del neurone e la produzione continuativa di placche $A\beta$ e grovigli neurofibrillari, può essere descritto come segue: uno dei due insulti cellulari, ossia stress ossidativo o disfunzione mitotica, può avviare un processo in cui i neuroni lasciano la fase G_0 di quiescenza ed entrano nella fase G_1 per poi andare incontro a morte apoptotica (Vincent et al., 1998), tuttavia nei cervelli AD i neuroni non mostrano segni di apoptosi come ci si aspetterebbe, ma al contrario rimangono in una fase G_1 permanente. I marcatori del ciclo cellulare come ciclina D, cdk4 e Ki67 e il complesso ciclina E/cdk4, che normalmente si trovano nel nucleo e sono necessari per esprimere i geni che permettono al neurone malato di andare in apoptosi, in questo “primo colpo” si trovano a livelli elevati nel citoplasma dei neuroni AD proprio a segnalare il

passaggio di questi ultimi alla fase G₁. Lo stato stazionario in cui si trovano i neuroni in questa fase potrebbe determinare l'accumulo dei NFTs e la sopravvivenza in questo stato anche per decenni, così come potrebbe indurre l'attivazione di una risposta compensatoria che porta alla produzione e accumulo del peptide A β (Moreira et al., 2008).

Il "secondo colpo" spiega invece che i neuroni perdono la capacità di andare incontro ad apoptosi; sembra che una volta entrati in G₁ non attivano la serie completa delle caspasi richieste per l'apoptosi neuronale. Al contrario i neuroni AD hanno una maggiore espressione delle caspasi a monte 8 e 9, mentre si mantengono a livelli di controllo le caspasi 3, 6 e 7; questo suggerisce che i neuroni AD vanno incontro ad "aborto" dell'apoptosi, fenomeno che probabilmente deriva dal fatto che i neuroni ricevono i segnali apoptotici ma non riescono a diffonderli alle caspasi effettrici a valle (Raina et al., 2000; Atwood and Bowen, 2015).

Nella malattia di Alzheimer, il rientro neuronale nel ciclo cellulare porta al completamento della fase S ma non la divisione cellulare (Yang et al., 2001). Sembrerebbe probabile che, il ritorno di alcuni neuroni nel ciclo cellulare sia un tentativo di sostituire i neuroni danneggiati e i NFTs possono quindi essere il risultato di un nuovo tentativo di rientro nel ciclo che però fallisce, ed in effetti numerosi esempi di tentativi di divisione cellulare falliti sono stati osservati in sezioni postmortem di cervelli affetti da Alzheimer (Kozlov et al., 2017).

Sulla base di questa ipotesi dunque, la deregolazione del controllo del ciclo cellulare è parte integrante della malattia di Alzheimer anche se non sono ancora chiari i meccanismi alla base di questo, ed è stato proposto che il rientro anormale del ciclo cellulare aumenta la possibilità di un nuovo target per l'intervento terapeutico mediante inibitori del ciclo cellulare (Atwood and Bowen, 2015).

L'ippocampo

Il cervello umano è formato da miliardi di neuroni, esempi di alto differenziamento morfologico e biochimico e a differenza della maggior parte delle altre cellule che hanno una vita piuttosto breve, le cellule nervose, che si generano nel feto, vivono per lungo tempo. In un adulto, quando i neuroni muoiono a causa di una malattia, questi non sono sostituiti, tuttavia, recenti studi, hanno mostrato che in alcune aree del cervello possono generarsi nuovi neuroni anche in un cervello anziano.

La malattia di Alzheimer interrompe i processi che mantengono i neuroni sani e questa interruzione fa sì che le cellule nervose perdano la possibilità di trasmettere impulsi nervosi, quindi vengono meno le connessioni sinaptiche con altre cellule nervose, ed infine muoiono. La morte neuronale causa deficit nella memoria, cambiamenti della personalità ed altre conseguenze che sono segni tipici della malattia. La caratteristica macroscopica più evidente nel cervello di soggetti affetti da Alzheimer è l'atrofia corticale che colpisce prevalentemente i lobi temporali mediani, con conseguente dilatazione dei ventricoli laterali.

Ancora oggi non si sa come inizi il processo che porta allo sviluppo di questa malattia o perché alcuni dei normali cambiamenti associati all'invecchiamento diventino così estremi nell'AD. È chiaro però che la malattia si sviluppa a livello della corteccia entorinale (EC, *Entorinal Cortex*), che è connessa all'ippocampo, struttura essenziale per la formazione della memoria a breve termine, quindi si diffonde a questa regione per poi raggiungere e colpire le altre aree cerebrali.

L'ippocampo è una delle prime strutture cerebrali a sviluppare cambiamenti neurodegenerativi nell'AD, subendo un accumulo abbondante di NFTs, ma una minore deposizione di A β , nelle prime fasi della malattia. Le lesioni patologiche dell'AD e perdita neuronale si trovano in più regioni dell'ippocampo, a livello del quale compaiono molto presto, nonché nella corteccia transentorinale ed entorinale.

Anatomia e caratteristiche dell'ippocampo in AD

L'ippocampo è il componente chiave del circuito di memoria del lobo temporale mediale (MTL, *Medial Temporal Lobe*) e il termine di “formazione ippocampale” include le cortecce transentorinale ed entorinale, il *giro dentato*, l'ippocampo vero e proprio o *corno di Ammonio* e il complesso subicolare. Il solo termine “ippocampo” è comunemente usato per indicare il giro dentato e il corno di Ammonio. Il *giro dentato* è uno strato strettamente compresso costituito da piccole cellule granulari disposte attorno all'estremità dell'ippocampo, costituendo una caratteristica forma a “v”; il *Corno di Ammonio* (CA, *Cornus Ammonis*) emerge dal *giro dentato* (DG, *Dentate Gyrus*) ed è suddiviso in CA4, CA3, CA2 ed infine CA1 la quale si fonde con il subiculum e rappresenta la zona di transizione con la corteccia entorinale (fig. 23 B) (Mufson et al., 2015).

Nella formazione ippocampale ci sono due classi di neuroni: i *neuroni principali* (o di proiezione) che rappresentano la maggior parte dei neuroni e gli *interneuroni*, cellule con corti assoni: i primi sono neuroni eccitatori (glutamatergici), hanno spine dendritiche ed includono le cellule granulari del DG, i neuroni piramidali del corno di Ammonio e le cellule piramidali del complesso subicolare; i secondi sono neuroni inibitori (GABAergici), hanno varie caratteristiche morfologiche e neurochimiche e si trovano in tutte le regioni a strati della formazione ippocampale.

La stragrande maggioranza dei neuroni del DG sono le cellule granulari, mentre nel corno di ammonio il tipo cellulare più comune è la cellula piramidale. Di conseguenza gli strati cellulari dell'ippocampo sono indicati come: *strato granulare*, nel caso del DG e i cui strati sovrastanti e sottostanti sono chiamati rispettivamente strato molecolare e polimorfico; *strato piramidale* nel resto della struttura, il cui strato formato dai dendriti apicali dei neuroni piramidali viene chiamato *radiale*, mentre quello adiacente alla fessura dell'ippocampo, sopra lo strato di cellule piramidali delle regioni CA1-CA3, viene chiamato *strato lacunoso-molecolare* (Llorens-Martín et al., 2014).

Il principale input corticale all'ippocampo e al giro dentato è dato dalla EC attraverso la cosiddetta “via perforante” che coinvolge gli strati II e III della stessa EC: i neuroni dello strato II si proiettano al DG e alla regione CA3, mentre i neuroni dello strato III si proiettano verso la regione CA1 e il subiculum. Recentemente studi su topi hanno dimostrato che CA2, che di solito non è inclusa in questo circuito ippocampale, ha dimostrato invece di avere

anch'essa un ruolo in questo circuito ed anche nelle funzioni relative alla memoria. Secondo questi studi, il DG proietta anche su CA2 che risulta a sua volta connesso con CA1, ed inoltre CA3 e CA2 sono reciprocamente connessi. Quindi, CA2 riceve input dallo strato II della EC e viceversa CA2 proietta di nuovo a questo strato (Kohara et al., 2014).

Numerosi studi hanno dimostrato che le lesioni neuronali della regione CA1 sono sufficienti per la compromissione della memoria, tipica della malattia di Alzheimer e questa sembra essere correlata al danno neuronale dello strato II della EC (Llorens-Martin et al., 2014). In effetti è stato dimostrato che la EC risulta essere danneggiata nelle prime fasi della malattia, sono presenti pre-grovigli e NFTs che rappresentano lo stadio iniziale della degenerazione neurofibrillare come descritto da Braak e Braak nel 1991. Se la presenza di tau anomala procede in modo gerarchico, allora la diffusione di questi grovigli dovrebbe seguire le principali regioni della "via perforante" cioè, DG, CA3, CA1 e subiculum; in realtà vari studi hanno dimostrato che il DG non sembra essere coinvolto in questa propagazione ma è colpito dalla riduzione dei rami dendritici e dalla perdita di spine con la progressione dell'AD, invece una cospicua quantità di pre-grovigli è stata rilevata nei neuroni piramidali della CA3, ma ancora più compromessa appare la regione CA1 dell'ippocampo, fondamentale nell'orientamento spaziale, nell'apprendimento e nelle diverse funzioni di memoria, in cui le cellule piramidali al suo interno risultano essere maggiormente colpite principalmente nelle fasi iniziali della malattia di AD. Sono state riportate una varietà di alterazioni in CA1 in pazienti con AD, come una diminuzione del numero di neuroni che si traduce in un'atrofia dello strato cellulare piramidale di CA1 e alterazioni neuronali, inclusi cambiamenti dendritici (fig. 23 A) (Furcila et al., 2018; Yang et al., 2018).

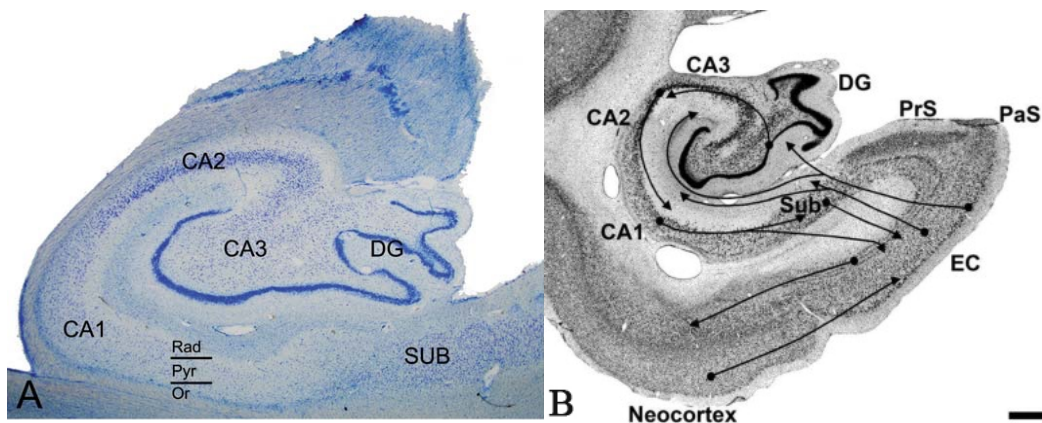


Figura 23. Formazione ippocampale di soggetto con AD e sano. A) Ippocampo di un paziente con AD con colorazione di Nissl per illustrare le varie regioni ippocampali; da notare la perdita neuronale in CA1. B) Ippocampo tipico di un soggetto sano (modificata da: Furcila et al., 2018; Lavanex and Lavanex, 2013).

L'atrofia dell'ippocampo nell'AD è stata interpretata come secondaria rispetto alla formazione di grovigli neurofibrillari, atrofia dei neuroni e perdita di neuroni, tuttavia, la causa dell'atrofia dei neuroni non è stata esaminata in dettaglio, sebbene una delle cause più plausibili sia la ridotta sintesi proteica, in quanto studi condotti hanno identificato la composizione alterata dei ribosomi e livelli di espressione anormali di alcuni fattori di trascrizione e alterata sintesi proteica nelle aree corticali nei casi con lieve deficit cognitivo e AD. Le principali modifiche sono state la riduzione dei livelli di rRNA, la superficie delle NORs/superficie totale del nucleo ridotta e il promotore di rDNA ipermetilato in AD, suggerendo così un silenziamento epigenetico di rDNA in tempi molto precisi della progressione dell'AD. Insieme, questi risultati suggeriscono uno scenario complesso in cui diversi percorsi, dal nucleo e dal nucleolo al ribosoma, sono alterati nella corteccia cerebrale nell'AD (Hernandez-Ortega et al., 2015).

Alterazioni morfologiche dei neuroni ippocampali in AD

È importante descrivere i cambiamenti nella morfologia dell'albero dendritico e delle spine dendritiche dei neuroni granulari del DG (Llorens-Martin et al., 2013) e i cambiamenti nel numero e nel volume delle spine dendritiche dei neuroni piramidali della regione CA1 dell'ippocampo in pazienti con AD (Merino-Serrais et al., 2013). Questi cambiamenti sono indicativi di alterazioni nell'input sinaptico di questi neuroni.

- *Cellule granulari*: La morfologia dei neuroni granulari maturi presenti nella DG è stata ampiamente caratterizzata ed è richiesta una morfologia specifica simile ad una Y per il corretto funzionamento di questi neuroni (Khan et al., 2014). Recentemente, è stato scoperto che, nei pazienti con AD, è presente un'alta percentuale di neuroni granulari con una morfologia a forma di V ed una densità inferiore di spine dendritiche rispetto ai controlli.

Le spine dendritiche delle cellule granulari subiscono un processo continuo e dinamico che sembra essere correlato alla formazione di nuove sinapsi necessarie per l'acquisizione di nuovi ricordi relativi all'ippocampo. È stato suggerito che la formazione di una nuova sinapsi in un neurone neonato può comportare la sostituzione di una vecchia connessione con una nuova connessione (Toni and Sultan, 2011). Nell'AD questa sostituzione non avviene correttamente nel DG e di

conseguenza, il numero di vecchie connessioni potrebbe essere elevato portando ad una compromissione della formazione di nuovi ricordi. Pertanto, per quanto riguarda il percorso $EC \rightarrow DG \rightarrow CA3 \rightarrow CA1$, si può proporre che nei pazienti con AD le nuove connessioni tra neuroni della CE e neuroni neonati del DG siano probabilmente compromesse (Llorens-Martin et al., 2014).

- *Neuroni piramidali CA1*: L'atrofia dell'ippocampo, come detto prima, è una caratteristica patologica ben nota dell'AD anche se non è ancora chiaro quale sia l'influenza della presenza di tau anomala nella microanatomia delle cellule piramidali. A tal proposito sono stati condotti degli studi per analizzare i cambiamenti nelle spine dendritiche dei neuroni con tau patologica su tessuti di pazienti affetti da AD mediante immunofluorescenza con anticorpi anti-fosfo-tau (Merino-Serrais et al., 2013). È stato osservato che nelle prime fasi della patologia neurofibrillare (presenza diffusa di pre-grovigli) i neuroni piramidali non mostrano alterazioni. Tuttavia, una volta formati i NFTs, sono state osservate riduzioni significative del diametro, del numero, della lunghezza e volume dei dendriti e delle spine dendritiche. È noto che la perdita di spine dendritiche indica una disconnessione sinaptica, che chiaramente deve avere una conseguenza importante a livello cognitivo nei pazienti con AD. Pertanto, possiamo supporre che la caratteristica compromissione cognitiva nell'AD dipende dal numero relativo di neuroni che hanno grovigli ben sviluppati (Merino-Serrais et al., 2013). Tutte queste osservazioni inoltre, supportano l'idea di una perdita sequenziale di spine dendritiche in associazione con la patologia tau intracellulare, che si verificano prima nelle regioni distali e poi in quelle più prossimali.

Materiali e metodi

Colture cellulari

Le colture cellulari derivano da cellule provenienti da un organo o un tessuto e rappresentano certamente dei sistemi semplificati, altamente riproducibili, che consentono il mantenimento di cellule *in vitro* utilizzate per lo studio di fenomeni biologici come per esempio crescita e differenziamento cellulare, studi riguardanti la biochimica e fisiologia cellulare, processi intracellulari e studi molecolari.

Per studi relativi alla biologia cellulare neuronale, vengono utilizzate le linee cellulari di neuroblastoma che costituiscono un eccellente modello di studio *in vitro* per comprendere i meccanismi molecolari alla base di specifici fenomeni cellulari e meccanismi neuropatologici.

Nel presente lavoro di tesi è stata utilizzata una linea cellulare stabilizzata di neuroblastoma umano quale la linea cellulare SK-N-BE, ed una coltura primaria a breve termine quale la coltura di linfociti da sangue periferico.

Coltura della linea cellulare SK-N-BE

La linea cellulare di neuroblastoma umano SK-N-BE è stata stabilizzata *in vitro* per la prima volta nel giugno del 1972 da una biopsia di midollo osseo proveniente da un bambino di soli due anni con neuroblastoma disseminato. Queste cellule presentano proprietà biochimiche tipiche delle cellule neuronali, capacità di sintetizzare e immagazzinare neurotrasmettitori e caratteristiche multipotenziali per quanto riguarda l'espressione di enzimi neuronali (Biedler et al., 1978).

Le cellule SK-N-BE crescono in monostrato e sono state coltivate in terreno RPMI 1640, integrato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), 1% di antibiotico Penicillina/Streptomina (100 U/ml; 100 µg/ml) e 1% di L-Glutamina, a 37°C, con 5% di CO₂.

Mantenimento della coltura cellulare

- Preriscaldare a 37°C il medium completo
- Asportare il terreno di coltura dalla flask
- Effettuare un lavaggio in PBS 1X sterile o con tripsina_EDTA a 37°C

- Tripsinizzare le cellule con tripsina EDTA (~ 0,7 ml in flask 25 cm² o ~ 1,5 ml in flask 75 cm²) ed incubare qualche minuto a 37°C fino al completo distacco delle cellule
- Inattivare la tripsina con 8 ml di medium completo
- Trasferire le cellule in provette sterili e centrifugare a 1100 rpm per 8 minuti
- Aspirare il surnatante, spezzare il pellet, risospendere in 5 ml di medium completo
- Conta cellulare in camera di Burker e semina alla concentrazione desiderata

Differenziamento della linea cellulare SK-N-BE

Le cellule SK-N-BE sono in grado di differenziare ed acquisire un fenotipo neuronale colinergico maturo (assimilabili dunque ai neuroni adulti) quando trattate con acido retinoico (RA, *All-trans retinoic acid*), un derivato della vitamina A che induce differenziazione ed arresta il ciclo cellulare, portando alla formazione di estesi processi neuritici che sono strutturalmente e fisiologicamente simili ai neuroni normali.

Le cellule SK-N-BE, nello specifico, sono state seminate su vetrino portaoggetto alla concentrazione di $5 \cdot 10^4$ cells/vetrino e poste in incubatore per 2 ore in modo da favorire l'adesione alla superficie del vetrino. Si procede al differenziamento in cellule neuronali mediante trattamento con acido retinoico 10 μ M (Sigma-Aldrich) aggiunto al terreno di coltura ogni 72 ore (giorno 0, 3, 6, 9) per ottenere cellule differenziate al dodicesimo giorno di trattamento (D'Alessio et al., 1995; Andres et al., 2013; Leotta et al., 2014).

Trattamento con actinomicina D

Le SK-N-BE replicative sono state incubate per 1 ora con 0,05 μ g/ml di actinomicina-D (Act-D), prima della raccolta e del successivo processamento, per ottenere il blocco di trascrizione (Perry and Kelley, 1970; Bensaude, 2011).

Coltura di Linfociti da sangue periferico

La coltura di linfociti da sangue periferico richiede l'utilizzo di un terreno di coltura appropriato in cui, in base alle esigenze sperimentali, può essere aggiunta una sostanza stimolante come la PHA-M (fitoemoagglutinina-M), capace di indurre *in vitro* l'attività mitotica di tali cellule.

I linfociti umani sono stati ottenuti, da volontari sani, mediante prelievo di sangue venoso e quindi inseriti in provette eparinizzate. La semina dei linfociti da sangue periferico può essere effettuata o utilizzando sangue intero o eseguendo la separazione linfo-monocitaria mediante l'utilizzo di sostanze quali Ficoll o LSM (Lymphocyte Separation Medium).

I linfociti da sangue periferico sono stati coltivati in terreno RPMI 1640, integrato con il 20% di siero fetale bovino (FBS), 1% di antibiotico Penicillina/Streptomicina (100 U/ml; 100 µg/ml), 1% di L-Glutamina e 3% di fitoemoagglutinina (PHA) per 72 ore a 37°C, con 5% di CO₂.

Protocollo di allestimento della coltura

- Preriscaldare a 37°C il medium completo
- Preparare un tubo sterile contenente eparina (5000 UI/ml) ed introdurvi sterilmente il sangue appena prelevato
- Aggiungere il sangue eparinizzato in flask da 25 cm² o 75 cm² contenenti terreno completo, considerando il rapporto ottimale di semina sangue/terreno di 1:10
- Porre la coltura in incubatore a 37°C e 5% di CO₂ per 72 ore

Separazione dei linfociti da sangue periferico

I linfociti possono essere isolati dalle varie componenti del sangue mediante l'utilizzo della soluzione LSM (Lymphocyte Separation Medium) contenente 6,2 g Ficoll e 9,4 g di diatrizzato di sodio per 100 ml. Il sangue eparinizzato viene diluito con soluzione fisiologica in rapporto 1:1 e posto al di sopra della soluzione LSM creando un'interfaccia sangue-LSM. A seguito di una centrifugazione si assisterà alla migrazione differenziale delle varie componenti del sangue nella provetta, precisamente eritrociti e granulociti si posizioneranno sul fondo, mentre i linfociti e le altre cellule mononucleate, come monociti

e piastrine, si posizioneranno nell'interfaccia plasma-LSM. Una volta isolati i linfociti possono essere utilizzati per procedure secondarie quali estrazione di DNA o RNA o posti in coltura.

Procedura

- Preparare una provetta sterile contenente eparina (3 μ l per ml di sangue) ed introdurvi il sangue appena prelevato
- Miscelare completamente la soluzione LSM invertendo delicatamente la bottiglia
- Mettere 3 ml di LSM in una provetta sterile
- Miscelare 2 ml di sangue eparinizzato con 2 ml di soluzione fisiologica
- Introdurre delicatamente il sangue diluito sopra i 3 ml di LSM nella provetta sterile creando un'interfaccia sangue-LSM; fare attenzione a non miscelare il sangue con LSM
- Centrifugare a 1400 rpm a temperatura ambiente per 30 minuti (con la centrifugazione dovrebbero sedimentare eritrociti e granulociti, mentre i linfociti e altre cellule mononucleari, come monociti e piastrine, dovrebbero trovarsi sopra lo strato di LSM, nell'interfaccia plasma-LSM)
- Aspirare lo strato di plasma fino a 2-3 mm sopra lo strato di linfociti
- Aspirare lo strato di linfociti più circa metà dello strato di LSM sottostante e trasferirlo in una provetta sterile
- Aggiungere un volume uguale di PBS 1X sterile (o terreno non completo) allo strato di linfociti e centrifugare per 10 minuti a T.A. (18-25°C) ad una velocità sufficiente a far sedimentare i linfociti senza danneggiarli (1200 rpm)
- Fare un altro lavaggio in PBS 1X e continuare con le procedure di interesse

Immunofluorescenza su colture cellulari

L'immunofluorescenza è una tecnica che permette di visualizzare la reazione antigene-anticorpo marcando uno dei due reagenti con molecole chiamate fluorocromi e quindi permette di localizzare facilmente una proteina di interesse.

Gli esperimenti di immunofluorescenza, sono stati eseguiti coltivando le cellule SK-N-BE in chamber-slides, mentre i linfociti umani sono stati citocentrifugati su vetrini. Successivamente entrambe le tipologie cellulari sono state fissate in paraformaldeide per preservare e mantenere l'organizzazione strutturale e la permeabilizzazione delle loro membrane cellulari è stata ottenuta mediante triton per facilitare il passaggio dell'anticorpo e conservare l'antigenicità. Infine, dopo aver saturato i siti di legame aspecifici mediante una soluzione bloccante, le cellule sono state incubate con specifici anticorpi primari e secondari e successivamente analizzati i risultati mediante microscopia a fluorescenza e con microscopia a scansione laser confocale (CLSM).

Protocollo di immunofluorescenza singola e *dual color* su colture cellulari

- Lavare le cellule, con PBS 1X per 5'
- Fissare con pFA 4% - saccarosio 3% in PBS 1X per 20' a TA
- 2 lavaggi con glicina 10 mM in PBS 1X per 5' a TA
- Permeabilizzare con Triton 0,5% in PBS1X per 15' a TA
- Incubare con blocking solution (100 µl per vetrino) in camera umidificata o/n a 37 °C
- Sgocciolare senza asciugare e incubare o/n a 37 °C con 100 µl di anticorpo primario, o con 100 µl di anticorpi primari (mouse e rabbit), diluito in blocking solution
- 3 lavaggi con PBS-Tween per 5' a 37 °C con agitazione
- Incubare per 1 h a 37 °C in camera umidificata con 100 µl di anticorpo secondario o con 100 µl di anticorpi secondari (anti mouse-FITC e anti rabbit-TRITC) in blocking solution alla diluizione di lavoro consigliata dalla casa produttrice
- 3 lavaggi con PBS-Tween per 5' a 37 °C con agitazione
- Deidratare in alcool 70%, 85%, 95% 1 x 5' cad.
- Asciugare i vetrini all'aria
- Colorare con DAPI
- Fissare il coprioggetto con rubber cement

Sezioni di tessuto umano

Gli studi effettuati su sezioni di tessuto cerebrale umano, sono stati possibili grazie alle collaborazioni con l'istituto di neuropatologia IDIBELL dell'ospedale universitario Bellvitge di Barcellona e con il dipartimento di patologia dell'ospedale universitario Fundación de Alcorcón, Madrid (HUFA). In particolare, i campioni di cervello sono stati ottenuti dalla biobank dell'istituto di neuropatologia HUB-ICO-IDIBELL.

La regione cerebrale esaminata nel presente lavoro di tesi è l'ippocampo, in quanto maggiormente colpita dagli elementi neuropatologici caratteristici della malattia di Alzheimer.

Sono state analizzate due regioni in particolare dell'ippocampo quali, la regione CA1 e il giro dentato che differiscono tra loro per le tipologie cellulari presenti: la prima caratterizzata da neuroni piramidali, la seconda da neuroni granulari. Gli studi sono stati condotti su sezioni di tessuto derivanti da individui a diverse età quali feto, giovani (tra i 20 e i 40 anni), adulti (tra i 40 e i 60 anni) e senili (più di 60 anni), e da individui affetti da AD-I ed AD-IV.

Immunofluorescenza su sezioni di tessuto umano

Le sezioni di tessuto incluse in paraffina per gli studi di immunofluorescenza, sono state inizialmente deparaffinate in xilene e reidratate in alcoli. Poiché i tessuti emettono autofluorescenza e ciò rende difficile distinguere i segnali specifici di immunofluorescenza, i campioni sono stati sottoposti ad un trattamento a caldo con tampone citrato e successivamente trattate con Sudan black B, un colorante specifico che neutralizza tale autofluorescenza (Oliveira et al., 2010).

I siti di legame aspecifici sono stati saturati mediante incubazione con una soluzione bloccante e successivamente sono state ottenute immunolocalizzazioni doppie tramite incubazioni con specifici anticorpi primari e secondari. Gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte per confermare i risultati, analizzati poi mediante microscopio confocale a scansione laser (CLSM) Zeiss LSM700 dotato di obiettivi 40x e 63x. Il software ZEN2010 è stato utilizzato per l'acquisizione di immagini e ricostruzioni 3D.

Protocollo di IFI *dual color* su sezioni di ippocampo

- Porre i vetrini a 55 °C in stufa per 20'
- Deparaffinare in xilene per 5'
- Reidratare in alcoli 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 35%, H₂O distillata, 2' cad e 5' in H₂O distillata
- Trattamento con tampone citrato per 20': portare la soluzione ad ebollizione e dopo introdurre i vetrini
- Riportare a temperatura ambiente
- Lavaggio in H₂O bidistillata 1 x 5' con agitazione
- Porre in etanolo 70% 1 x 5'
- Trattamento con Sudan Black B per 30'
- Lavaggio in etanolo 70% 1 x 5' con agitazione
- Lavaggio in H₂O bidistillata 1 x 5' con agitazione
- Lavaggi in PBS 1X 3x5' con agitazione
- Incubazione con Blocking solution (100 µl per vetrino) in camera umidificata o/n h a 4°C
- Sgocciolare senza asciugare e incubare overnight a 4 °C con 100 µl di anticorpi primari (mause e rabbit) alla diluizione di lavoro consigliata dalla casa produttrice
- Lavaggio con PBS-Tween 3 x 5' a 37 °C con agitazione
- Incubare per 1 h a 37 °C in camera umidificata con 100 µl di anticorpi secondari (anti mouse-FITC e anti rabbit-TRITC) in blocking solution alla diluizione di lavoro consigliata dalla casa produttrice
- Lavaggi con PBS-Tween 3 x 5' a 37 °C con agitazione
- Deidratare in alcool 70%, 85%, 95% 1 x 5' cad.
- Asciugare i vetrini all'aria
- Colorare con DAPI
- Fissare il coprioggetto con rubber cement

Immunoistochimica su sezioni di tessuto umano

L'immunoistochimica è una metodica che consente di individuare specifiche proteine o strutture subcellulari e studiarne la distribuzione spaziale in cellule e tessuti. Si basa sul principio di coniugazione antigene-anticorpo e su sistemi di rilevazione (enzimatici, fluorescenti) che consentono la visualizzazione *in situ* dell'antigene tramite tecniche di microscopia. Nel presente lavoro di tesi, l'immunoistochimica è stata eseguita su sezioni di ippocampo umano da 4µm, incluse in paraffina.

Protocollo di immunoistochimica su sezioni di ippocampo

- Deparaffinare in xilene per 5'
- Reidratare in alcoli 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 35%, H₂O distillata, 2' cad e 5' in H₂O distillata
- Trattamento con tampone citrato a pH 6,0 per 20' a 96 °C
- Riportare a temperatura ambiente
- Lavaggio in *Dako Wash Buffer* 1 x 5' con agitazione
- Inibizione delle perossidasi mediante incubazione con *Dako Peroxidase Blocking Reagent* per 5'
- Lavaggio in *Dako Wash Buffer* 1 x 5' con agitazione
- Pre-incubazione con soluzione bloccante contenente BSA 1 ora a 37 °C
- Lavaggio in *Dako Wash Buffer* 1 x 5' con agitazione
- Incubazione con specifici anticorpi primari per 30 minuti a temperatura ambiente
- Lavaggio in *Dako Wash Buffer* 1 x 5' con agitazione
- colorazione mediante EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER), 3'3-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB).
- Fissare il coprioggetto con rubber cement

Real Time PCR

La real time PCR o qPCR (PCR quantitativa) è una tecnica che consente di effettuare una valutazione quantitativa, in tempo reale, dell'espressione di uno specifico gene di interesse all'interno di un campione biologico. La quantificazione dei prodotti di PCR viene rilevata ad ogni ciclo di amplificazione mediante l'emissione di un segnale di fluorescenza che riflette la quantità iniziale di mRNA. Esistono due metodi di quantificazione dell'espressione del gene di interesse, la *quantificazione assoluta* e la *quantificazione relativa*. La prima determina l'esatto numero di copie di mRNA target di partenza in riferimento ad una curva di calibrazione. La quantificazione relativa, la più utilizzata negli studi di espressione genica, determina i cambiamenti dei livelli di espressione di un gene target rispetto ad uno o più controlli interni, ossia un gene di riferimento che può essere co-amplificato insieme al gene target di interesse (es. ACTB).

Nel presente lavoro di tesi, per ogni esperimento di quantificazione relativa dei geni oggetto di analisi e studio sono stati necessari:

- *Geni Target*, ossia le sequenze di DNA di interesse da analizzare mediante l'utilizzo di primers specifici;
- *Calibratore*, ossia il campione di riferimento da utilizzare per l'analisi comparativa; nel caso delle cellule di neuroblastoma umano proliferative e differenziate il calibratore è costituito dalle stesse cellule proliferative, mentre per i linfociti umani con e senza PHA è costituito dai linfociti senza PHA;
- *Controllo Endogeno*, un gene espresso costitutivamente in tutti i campioni analizzati (gene housekeeping), necessario per normalizzare i dati rispetto alla quantità di campione caricato e a possibili variazioni di efficienza della reazione che in questo caso è stato il gene per la β -actina, ACTB.

Il rilevamento e la quantificazione dei trascritti MAPT sono stati ottenuti mediante qPCR, con lo strumento Applied Biosystems StepOne™, utilizzando primer specificati nella sezione risultati e discussione. Gli esperimenti sono stati eseguiti con kit *SensiFAST™ SYBR® & Fluorescein* (Bioline) secondo le istruzioni del produttore. Gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte.

Per l'analisi dei dati viene utilizzato il C_t , ovvero il numero del ciclo di amplificazione in cui il segnale della fluorescenza incontra la linea di threshold, cioè il livello di segnale che presenta un significativo incremento rispetto all'emissione dei primi cicli di amplificazione considerati "rumore di fondo". Inizialmente viene normalizzato il valore del C_t del gene target con quello del controllo endogeno scelto, ottenendo il ΔC_t dalla differenza $C_{t \text{ gene interesse}} - C_{t \text{ controllo}}$. Successivamente viene ottenuto il $\Delta\Delta C_t$ normalizzando il ΔC_t del campione di interesse con quello del calibratore; infine viene applicata la formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ per determinare la concentrazione relativa (RQ) del gene target nel campione di interesse.

La real time PCR consente dunque di effettuare studi di espressione genica in modo rapido, accurato e sensibile stabilendo i livelli di mRNA nei campioni biologici di interesse. In combinazione con la PCR a trascrizione inversa (RT-PCR), i saggi di real time PCR possono essere utilizzati per quantificare precisamente i cambiamenti nell'espressione genica, come un aumento o una diminuzione dell'espressione di geni target in risposta a diverse condizioni ambientali o trattamenti.

Protocollo di qPCR con kit SensiFAST™ SYBR® & Fluorescein

Per valutare i diversi livelli di trascritti MAPT, abbiamo utilizzato il metodo di quantificazione relativa con actina-b (ACTB, da Sigma-Aldrich) come controllo endogeno e cellule replicative SK-N-BE come riferimento per il calibratore. I dati di quantificazione relativa sono stati ottenuti come descritto sopra.

- Aggiungere in una eppendorf per PCR posta in ghiaccio, i seguenti componenti:

Componenti	Quantità
SensiFAST™SYBR® & Fluorescein mix (2x)	10 µl
Primer Forward	0,4 µl
Primer Reverse	0,4 µl
Template	1-2 µl
H ² O DEPC	Fino a 20 µl

Condizioni specifiche di amplificazione mediante qPCR

- 94 °C per 5 minuti
- 40 cicli a:
 - 95 °C per 30 secondi
 - 60 °C per 30 secondi
 - 72 °C per 15 secondi
- Curva di melting da impostare nello strumento

Estrazione di RNA da colture cellulari

Per l'analisi dell'espressione genica è necessario innanzitutto estrarre l'RNA dal campione oggetto di studio, che in questo caso è rappresentato sia dalle cellule di neuroblastoma umano SK-N-BE in condizioni replicative e differenziate a seguito del trattamento con acido retinoico, che dai linfociti umani indotti e non indotti da PHA.

L'estrazione è stata eseguita con *TRI Reagent* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), reagente costituito da una miscela di guanidina isotiocianato e fenolo in una soluzione monobasica e con *estrattore automatico MagCore*[®].

Il TRI Reagent consente di mantenere l'integrità degli acidi nucleici e allo stesso tempo di lisare la cellula e distruggerne i componenti. La guanidina isotiocianato è sia un potente inibitore delle RNasi e DNasi, sia un agente capace di rompere i legami idrofobici e idrogeno importante per la denaturazione delle proteine. Una volta avvenuta la lisi e bloccate le RNasi, si prosegue con l'aggiunta del cloroformio che, insieme al fenolo contenuto nella miscela del TRI Reagent, e dopo centrifugazione, permette la separazione della miscela in tre fasi ben distinte e visibili ad occhio nudo: una fase acquosa contenente RNA in superficie, un'interfase contenente DNA e una fase organica sedimentata che contiene proteine.

L'estrattore automatico MagCore[®] consente di purificare automaticamente in maniera semplice e veloce l'RNA, mediante l'utilizzo dell'opportuno kit di estrazione. Partendo da un numero noto di cellule, queste vengono prima risospese in un buffer di lisi contenente β -mercaptoetanolo e successivamente, i campioni così preparati, vengono

posti negli appositi rack dell'estrattore automatico, insieme ad una ulteriore eppendorf contenente DNase per degradare il DNA genomico ed alle cartucce di reagenti necessari alla purificazione dell'RNA. L'estrazione avverà poi mediante separazione con biglie magnetiche ed eluizione del campione in apposite eppendorf.

Protocollo di estrazione RNA con TRI Reagent (Sigma – Aldrich)

- Aspirare il medium dalla flask ed effettuare un lavaggio con PBS 1X sterile
- Tripsinizzare le cellule
- Inattivare la tripsina con medium completo e centrifugare a 1100 rpm per 8'
- Rimuovere il surnatante e spezzare il pellet cellulare
- Risospendere il pellet cellulare in 1 ml di TRI Reagent
- Raccogliere e versare in una eppendorf da 2 ml RNase/DNase free
- Vortexare 30" ed incubare per 5' a T.A.
- Aggiungere 200 µl di cloroformio per ogni ml di TRI Reagent utilizzato
- Vortexare 20" ed incubare 10' in ghiaccio finchè non si osserva la separazione delle fasi
- Centrifugare a 12000 rpm per 15' a 4 °C. al termine della centrifugazione si saranno separate le tre fasi: la fase acquosa trasparente (RNA), l'interfase (DNA) e la fase organica che comprende proteine e lipidi.
- Raccogliere la fase acquosa in una nuova eppendorf ed aggiungere un egual volume di isopropanolo freddo
- Vortexare 30" ed incubare 10' in ghiaccio
- Centrifugare a 14000 rpm per 30' a 4 °C
- Eliminare il surnatante ed aggiungere 1 ml di Etanolo 75% in H₂O DEPC
- Centrifugare a 14000 rpm per 5' a 4 °C
- Eliminare il surnatante, fare evaporare tutto l'etanolo
- Risospendere in H₂O DEPC alla concentrazione voluta

Protocollo di estrazione RNA con estrattore automatico MagCore®

- Contare le cellule, prelevare il volume adeguato (fino a 1×10^6 cellule) e trasferire in *sample tube*
- Centrifugare per 5' a 1400 rpm
- Eliminare il surnatante e spezzare il pellet
- Aggiungere 200 μ l di RB buffer contenente β -ME al pellet cellulare e miscelare mediante vortex
- Porre il campione in posizione 4 del T-Rack
- Porre la DNase, precedentemente preparata, in posizione 3 del T-Rack
- Porre il puntale, *l'elution tube* rispettivamente in posizione 2 e 1 del T-Rack
- Inserire la cartuccia dei reagenti nell'apposito alloggiamento dello strumento
- Impostare i parametri ed avviare il programma di estrazione

Reverse transcription PCR (RT-PCR)

L'identificazione delle differenti isoforme del gene *MAPT* nelle cellule di neuroblastoma umano SK-N-BE, è stata ottenuta mediante RT-PCR (PCR a trascrizione inversa). L'RNA estratto è stato retrotrascritto mediante l'azione di una trascrittasi inversa in cDNA. Il kit utilizzato per tale procedura è il *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen). I cDNA così ottenuti sono stati amplificati mediante PCR con condizioni di amplificazione specifiche, utilizzando una Taq DNA polimerasi ricombinante (Invitrogen) e successivamente è stata eseguita la corsa elettroforetica su gel di agarosio (ad una percentuale compresa tra 0,8 e 2%, a seconda delle dimensioni dei frammenti attesi) e i segmenti di DNA amplificati sono stati visualizzati mediante transilluminatore a luce blu con Imager Safe (Thermo Fisher Scientific, USA).

Protocollo di retrotrascrizione di RNA in cDNA

- Pre-riscaldare il termociclatore a 65 °C
- Aggiungere in una eppendorf da 0,2 ml posta in ghiaccio, i seguenti componenti:

Componenti	Quantità
RNA totale fino a 5 µg	<i>n</i> µl
Primers (50 µM oligo(dT) ₂₀ , o 2 µM primer gene-specifico, o 50 ng/µl random examers)	1 µl
Annealing Buffer	1 µl
H2O RNase/DNase-free	fino a 8 µl

- Incubare in termociclatore a 65 °C per 5' e porre immediatamente in ghiaccio per 1'
- Spinnare per raccogliere il contenuto sul fondo
- Aggiungere alla eppendorf posta in ghiaccio i seguenti componenti:

Componenti	Quantità
2X First-Strand Reaction Mix	10 μ l
SuperScript™ III/RNaseOUT™ Enzyme Mix	2 μ l

- Vortexare brevemente il campione e poi spinnare per raccogliere il contenuto sul fondo
- Incubare come segue:
 - oligo(dT)₂₀ o primer GSP: 50' a 50 °C
 - primer random examers: incubare 5-10' a 25 °C seguiti da 50' a 50 °C
- Terminare la reazione a 85 °C per 5' e porre immediatamente in ghiaccio
- Conservare i cDNA ottenuti a -20 °C o procedere con la PCR

Condizioni specifiche di amplificazione mediante PCR

- 94 °C per 5minuti
- 35 cicli a:
 - 95 °C per 30 secondi
 - 60 °C per 30 secondi
 - 72 °C per 40 secondi

nel caso di segmenti amplificati attesi più lunghi, la fase di allungamento è stata aumentata:

72 °C per 2 minuti e 30 secondi

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

L'analisi dei livelli di espressione e identificazione delle isoforme del gene TAU presenti, dei geni per gli rRNA in cellule SK-N-BE replicative e differenziate e del gene per la fibrillarina in linfociti indotti / non indotti da PHA, sono stati ottenuti mediante qRT-PCR utilizzando il kit *SuperScript® III Platinum® SYBR Green One-Step qRT-PCR* (Invitrogen) e lo strumento Applied Biosystems StepOne™. Per valutare il livello trascrizionale dell'rRNA abbiamo usato i primer elencati nella tabella..., specifici per amplificare un segmento dallo spacer trascritto esterno (ETS) del cluster genico dell'rRNA. Inoltre, sono stati utilizzati primer (vedi Tabella 1) specifici per amplificare i segmenti dalla regione del promotore non trascritto (controllo negativo) e dall' rRNA 18S, presente anche nei ribosomi maturi (controllo positivo). Per quantificare il trascritto di fibrillarina abbiamo usato coppie di primer precedentemente descritti (Koh et al., 2011). ACTB (Sigma-Aldrich) è stato utilizzato come controllo endogeno, le cellule SK-N-BE replicative e i linfociti umani non indotti da PHA come campioni di riferimento. Quindi, il rapporto RQ è stato utilizzato per confrontare i dati ottenuti nei diversi trattamenti cellulari.

Protocollo generale per qRT-PCR con kit SuperScript® III Platinum® SYBR Green One-Step

Il SuperScript® III Platinum® SYBR Green One-Step qRT-PCR è un kit specifico per effettuare reazioni di RT-PCR quantitativa in un unico step. Il kit infatti contiene l'enzima per effettuare la trascrittasi inversa, la Taq Polimerasi e una mix contenente buffer, SYBR Green, MgSO₄ e dNTPs. Sia la reazione di sintesi del cDNA che la PCR sono effettuati in un'unica provetta usando primer gene-specifici e un campione di RNA totale o mRNA. Quando viene prodotto il DNA a doppio filamento il SYBR Green, agente intercalante, si lega alla doppia elica e il segnale fluorescente prodotto, proporzionale alla concentrazione di mRNA iniziale, viene rilevato dallo strumento di real time.

Ciclo standard:

La mix di reazione viene preparata in ghiaccio miscelando le varie componenti nelle seguenti proporzioni:

Componenti	Quantità
SuperScript® III RT/Platinum® Taq Mix	0,4 µl
2XSYBR® Green Reaction Mix	10 µl
Forward primer, 10µM	0,4 µl
Reverse primer, 10µM	0,4 µl
Template (1pg – 1 µg RNA totale)	1-2 µl
H ₂ O DEPC	Fino a 20 µl

Programma per un ciclo standard su StepOne (Applied Biosystem):

- 50 °C per 3' per la sintesi del cDNA
- 95°C per 5'
- 40 cicli a:
 - 95°C per 15''
 - 60°C per 30''
- 40°C per 1'
- Curva di melting da impostare nello strumento:
 - 95°C per 15''
 - 60°C per 1'
 - 95°C per 15''

Analisi Western Blot

L'analisi Western blot consente l'identificazione, con un anticorpo specifico, di una determinata proteina presente all'interno di una complessa miscela di antigeni (o proteine) separate in un gel di poliacrilammide in base al peso molecolare e immobilizzate su una membrana. Il Western blot permette di monitorare l'espressione proteica in una cellula e quindi di determinare la presenza, quantità e peso molecolare di uno specifico antigene.

Nel presente lavoro, il Western blot è stato eseguito secondo le procedure descritte da Maugeri et al., 2015. Le proteine sono state estratte mediante l'utilizzo di un buffer 20 mM Tris (pH 7,4), 2 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, di mercaptoetanololo 50 mM, di saccarosio 0,32 mM, un cocktail di inibitore delle proteasi (Roche) e un cocktail di inibitore delle fosfatasi (Roche), utilizzando un omogeneizzatore di vetro teflonato. I campioni sono stati sonicati mediante sonda a ultrasuoni e centrifugati a 10.000 rpm per 10' a 4 ° C.

La concentrazione delle varie proteine è stata determinata tramite il kit *Quant-iT Protein Assay* (Invitrogen). Il campione proteico così ottenuto (30 µg) è stato diluito nel buffer Laemmli 2X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), riscaldato a 70 °C per 10' e quindi le diverse proteine sono state separate su un gel di poliacrilammide (4–15% Criterion™ XT Bis-Tris Protein Gel, BIO-RAD) mediante elettroforesi e trasferite su una membrana di nitrocellulosa (BIO-RAD). I blots ottenuti, sono stati incubati con Odyssey Blocking Buffer (LI-COR Biosciences) e successivamente con anticorpi primari e secondari appropriati. I segnali sono stati visualizzati con *Odyssey Infrared Imaging System* (Odyssey). Mediante l'utilizzo del software di elaborazione delle immagini *Image J* (NIH, Bethesda, MD), si procede con l'analisi densitometrica delle bande normalizzate alla β-tubulina che è stata utilizzata come controllo di caricamento.

Analisi statistica

Per l'analisi statistica, i dati sono rappresentati come media ± errore medio standard (S.E.M). L'analisi unidirezionale della varianza (ANOVA) è stata utilizzata per confrontare le differenze tra i gruppi e la significatività è stata determinata mediante l'utilizzo del test post statistico Tukey-Kramer. Le differenze tra i gruppi sono state considerate significative a *P < 0.05, **P < 0.01 e ***P < 0.001.

Risultati e Discussioni

Il gene MAPT nelle cellule SK-N-BE

Le cellule di neuroblastoma SK-N-BE sono un ottimo strumento per studiare geni coinvolti nel differenziamento cellulare. Tali cellule, sotto l'azione dell'acido retinoico,

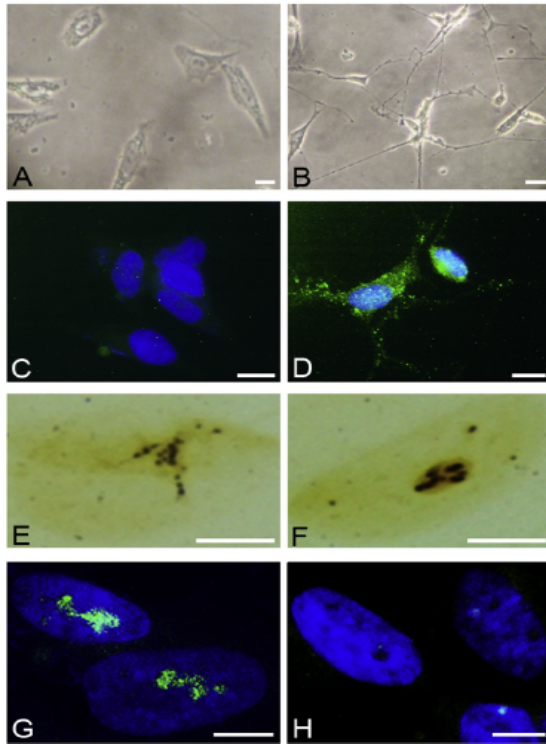


Figura 24. Differenziamento delle cellule SK-N-BE dopo trattamento con acido retinoico (RA) per 12 giorni. (A, B) Variazione della morfologia cellulare visibile come lunghe estensioni citoplasmatiche tra le cellule. (C, D) Espressione della proteina GAP-43 nelle cellule differenziate, assente nelle replicative. (E, F) Nucleolo delle cellule replicative con molte NORs attive, nelle cellule differenziate le NORs diminuiscono in numero e diventano più grandi. (G, H) La fibrillarina, specifica proteina nucleolare, presente nel nucleo delle cellule replicative, assente in quelle differenziate. In (C), (D), (G) e (H), i nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). Barre di scala: 20, 50 e 10 μ m rispettivamente in A, B e C/D. 5 μ m in E, F, G, H.

differenziano *in vitro* in cellule simili a neuroni. Tale differenziamento si manifesta già dopo 6 giorni di coltura in acido retinoico e al dodicesimo giorno le cellule presentano la morfologia caratteristica dei neuroni e l'espressione di specifici geni viene modulata di conseguenza (fig. 24).

Il differenziamento neuronale delle SK-N-BE si può verificare, oltre che dall'analisi della morfologia cellulare, anche dall'attivazione di GAP-43, dall'inattivazione della fibrillarina e dalla modifica della morfologia del nucleolo e in particolare dei NORs.

Il gene *MAPT*, che codifica per la proteina TAU, è stato analizzato nelle cellule SK-N-BE. In particolare, sono state analizzate le isoforme presenti in tali cellule e la quantità di trascritto delle isoforme identificate nelle SK-N-BE replicative e differenziate.

Nel sistema nervoso centrale, la proteina tau è ampiamente presente in sei isoforme diverse, a causa dello splicing alternativo dell'esone 2 (E2), dell'esone 3 (E3) e dell'esone 10 (E10).

Lo splicing alternativo è un evento molto importante nell'espressione del gene *MAPT* e potrebbe avere un ruolo di rilievo nei processi di neurodegenerazione o nella manifestazione della malattia di Alzheimer.

Splicing alternativo del gene MAPT

Lo splicing alternativo degli esoni 2 e 3, presenti nel dominio N-terminale, è associato con le isoforme denominate 0N (assenza degli esoni 2 e 3), 1N (solo esone 2) e 2N (presenza di entrambi gli esoni 2 e 3). Lo splicing alternativo dell'esone 10 invece, determina la formazione delle isoforme denominate 3R e 4R, che differiscono tra loro per il numero di elementi ripetuti presenti nel MBD al C-terminale del trascritto maturo. Pertanto, le sei possibili isoforme canoniche sono 2N4R, 2N3R, 1N4R, 1N3R, 0N4R, 0N3R (Andreadis, 2005; Wang and Mandelkow, 2016; Bukar Maina et al., 2016).

Tabella 3. Primers utilizzati per RT-PCR del gene

Primer	Type	Gene	Location	Nucleotide sequence (5'-3')
F1	Forward	MAPT	Exon-1	AACCAGGATGGCTGAGCCCC
F2	Forward	MAPT	Exon-2	CGGATCTGAGGAACCGGGCTC
F4	Forward	MAPT	Exon-4	TGAAGAAGCAGGCATTGGAG
R4	Reverse	MAPT	Exon-4	GTGACCAGCAGCTTCGTCTT
R5	Reverse	MAPT	Exon-5	ATCGCTTCCAGTCCCCTCT
R7	Reverse	MAPT	Exon-7	ATCCTGGTGGCGTTGGCCTG
R9	Reverse	MAPT	Exon-9	CTTCCCGCTCCCGCTGGTG
F9/10	Forward	MAPT	Exon-9/10	CGGGAAGGTGCAGATAATTAA
F9/11	Forward	MAPT	Exon-9/11	AGGCGGGAAGGTGCAAATA
R11	Reverse	MAPT	Exon-11	TGCTCAGGTCAACTGGTTTG
R12	Reverse	MAPT	Exon-12	CCCAATCTTCGACTGGACTC
R13	Reverse	MAPT	Exon-13	CAAACCCTGCTTGGCCAGGGA
F1/4	Forward	MAPT	Exon-1/4	GCTGGCCTGAAAGCTGAAG
F2/4	Forward	MAPT	Exon-2/4	CAACAGCGGAAGCTGAAGAA
F2/3	Forward	MAPT	Exon-2/3	ACTCCAACAGCGGAAGATGT
ntPr-F	Forward	rRNAs	Promoter (42805 ^(a))	GTGTGTCCTTGGGTTGACCA ^(b)
ntPr-R	Reverse	rRNAs	Promoter (42975 ^(a))	CCGACTCGGAGCGAAAGATA ^(b)
tETS-F	Forward	rRNAs	ETS (9 ^(a))	GCTGTCTCTGGCGAC
tETS-R	Reverse	rRNAs	ETS (120 ^(a))	CGGCAGCGGCTCAAG
t18S-F	Forward	rRNAs	18S rRNA (5340 ^(a))	CCCTGCCCTTTGTACACACC
t18S-R	Reverse	rRNAs	18S rRNA (5520 ^(a))	CCTTCCGCGAGTTACCTAC
FBL-F	Forward	FBL	Exon-5 ^(c)	TGGACCAGATCCACATCAA ^(d)
FBL-R	Reverse	FBL	Exon5/6 ^(c)	GACTAGACCATCCGACCA ^(d)
FH1-ACTB	Forward	ACTB	Exon-2	GACGACATGGAGAAAATCTG ^(e)
RH1-ACTB	Reverse	ACTB	Exon-2/3	ATGATCTGGTCACTTCTC ^(f)

L'identificazione delle isoforme del gene *MAPT* nelle cellule SK-N-BE replicative e differenziate è stata effettuata mediante RT-PCR con coppie di primer (tab. 3) che consentissero di evidenziare la presenza/assenza di tutti i 13 gli esoni di cui è composto il gene (fig. 25).

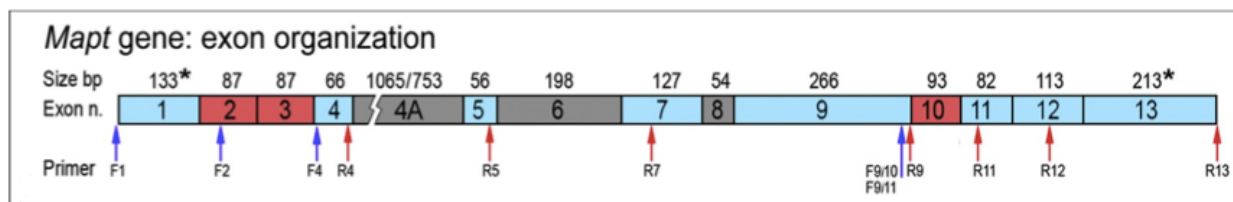


Figura 25. Organizzazione degli esoni del gene MAPT. In blu gli esoni costitutivi, in rosso gli esoni che vanno incontro a splicing alternativo nelle cellule neuronali, in grigio gli esoni generalmente non presenti nel trascritto delle cellule neuronali. La dimensione di ciascun esone è indicata nella parte superiore dello schema e corrisponde alla sequenza di codifica. La dimensione indicata dell'esone 1 (133*) inizia con il codone di inizio e quella dell'esone 13 (213*) termina con il codone di stop. I primer utilizzati per RT-PCR sono indicati in basso: le frecce blu e rosse indicano rispettivamente la posizione dei primer forward (F) e reverse (R).

Gli esoni 2 e 3

Per definire quali isoforme 0N, 1N e 2N siano presenti nelle SK-N-BE proliferative e differenziate, sono state effettuate RT-PCR con specifiche coppie di primer che consentissero di discriminare la presenza/assenza degli esoni 2 e 3. In dettaglio, le coppie di primer utilizzate sono state F1-R4 (forward all'interno dell'esone 1 e reverse all'interno dell'esone 4) e F2-R4 (forward all'interno dell'esone 2 e reverse all'interno dell'esone 4).

Con la coppia di primer F1-R4, i frammenti attesi per identificare le isoforme 0N, 1N e 2N sono rispettivamente 196 bp, 283 bp e 370 bp. Le dimensioni dei frammenti osservati su gel elettroforetico indicano che, la ripetizione 0N è ampiamente presente sia nelle cellule proliferative che in quelle differenziate, la ripetizione 1N è solo debolmente visibile nelle due tipologie cellulari, mentre la ripetizione 2N non è rilevabile né nelle cellule replicative né in quelle differenziate (tab. 4, fig. 26A).

Utilizzando invece la coppia di primer F2-R4 (forward all'interno dell'esone 2 e reverse all'interno dell'esone 4) i frammenti attesi consentono di definire la presenza/assenza delle isoforme 1N e 2N e precisamente di 115 bp per l'isoforma 1N e 202 bp per l'isoforma 2N. Le dimensioni dei frammenti osservati indicano che, l'isoforma 1N anche se rilevabile, sembra essere molto sottorappresentata (banda su gel di intensità molto bassa), mentre l'isoforma 2N non è rilevabile nelle cellule sia proliferative che differenziate.

Tabella 4. Presenza/assenza degli esoni 2 e 3.

Primer	Isoforma	Frammenti attesi (bp)	Frammenti osservati	
			SK-N-BE proliferative	SK-N-BE differenziate
F1-R4	0N	196	si	si
	1N	283	si	si
	2N	370	==	==
F2-R4	1N	115	si	si
	2N	202	==	==

Questi dati indicano che il gene *MAPT* nelle cellule SK-N-BE sia replicative che differenziate viene trascritto e il trascritto maturo nella isoforma 2N non è rilevabile. Questo è stato anche confermato con esperimenti di qRT-PCR (si veda paragrafo successivo).

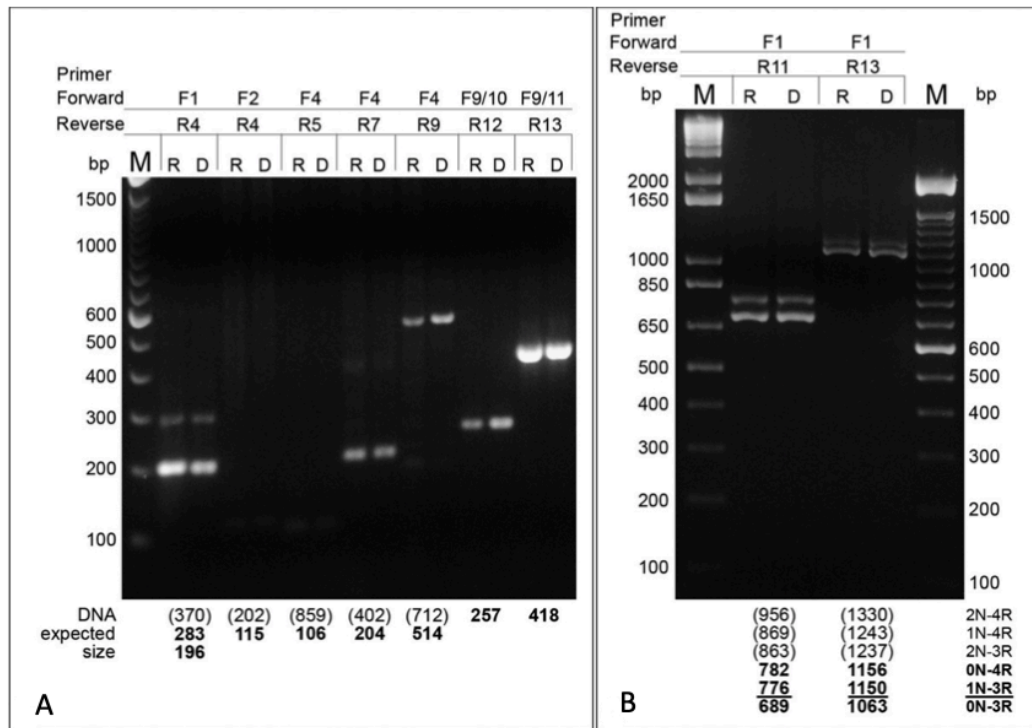


Figura 26. Splicing alternativo del gene MAPT nelle cellule SK-N-BE. (A) e (B) Risultati elettroforetici ottenuti da RT-PCR con i primers indicati nella parte superiore. M, indica il DNA marcatore. R e D indicano rispettivamente cellule replicative e differenziate. Nella parte inferiore sono indicate le dimensioni previste dei segmenti amplificati. I frammenti ottenuti o leggermente visibili sono indicati in grassetto. I frammenti non osservati sono indicati tra parentesi. Nella parte in basso a destra del pannello (B), le isoforme di Tau sono indicate in corrispondenza della dimensione del DNA amplificato ottenibile con i primers F1-R11 e F1-R13. L'isoforma sottolineata 1N3R, con dimensioni simili a 0N4R, non è presente nelle cellule, come dimostrato con qRT-PCR (vedi fig.27)

L'esone 10

Per valutare la presenza delle isoforme 3R e 4R sono state utilizzate diverse coppie di primer: F9/10-R12, presenta il forward posizionato in parte alla fine dell'esone 9 e in parte all'inizio dell'esone 10 (ritenzione dell'esone 10 nell'mRNA) tale per cui si ottiene l'isoforma 4R, il cui frammento atteso su gel elettroforetico è di 257 bp. La seconda coppia di primer, F9/11-R13, presenta il forward posizionato in parte all'interno dell'esone 9 e in parte all'inizio dell'esone 11 (esclusione dell'esone 10 nell'mRNA) per cui si ottiene l'isoforma 3R, il cui frammento atteso è invece di 418 bp (tab. 5).

I risultati ottenuti hanno evidenziato che, nelle cellule SK-N-BE sia proliferative che differenziate, l'esone 10 può essere presente o assente nell'mRNA, evidenziando così la presenza di almeno due diverse isoforme di *TAU* contenenti le ripetizioni 3R o 4R nella regione MBD (fig. 26A).

Tabella 5. Presenza/assenza dell'esone 10.

Primer	Isoforma	Frammenti attesi (bp)	Frammenti osservati	
			SK-N-BE proliferative	SK-N-BE differenziate
F9/10-R12	4R	257	si	si
F9/11-R13	3R	418	si	si

Gli esoni 4A, 6 e 8

Oltre all'analisi delle isoforme del gene *MAPT* che implicano la presenza/assenza degli esoni 2, 3 e 10 sono stati analizzati anche gli esoni 4A, 6 e 8, che possono dare origine a isoforme non canoniche. Infatti, l'esone 4A è presente solo nella cosiddetta big-tau, l'esone 6 la cui presenza o assenza rimane poco chiara, potrebbe far pensare a delle forme tronche della proteina tau, mentre l'esone 8 non risulta essere mai presente (Luo et al., 2004b; Andreadis, 2005).

Tabella 6. Presenza/assenza degli esoni 4A, 6 e 8.

Primer	Isoforma	Frammenti attesi (bp)	Frammenti osservati	
			SK-N-BE proliferative	SK-N-BE differenziate
F4-R5	+E4A	859	==	==
	-E4A	106	si	si
F4-R7	+E6	402	?	?
	-E6	204	si	si
F4-R9	+E6(-E8)	712	si	si
	-E6 (-E8)	514	==	==
	+E8 (+E6)	766	==	==
	+E8 (-E6)	568	==	==

Con la coppia di primer F4-R7 il punto di domanda sta ad indicare la presenza dubbia del frammento atteso, in quanto la banda su gel elettroforetico risulta debolmente visibile quindi di non certa interpretazione.

Per analizzare tali esoni, sono state utilizzate le coppie di primer riportate nella tabella 6 in cui è presente anche la dimensione attesa dei frammenti di DNA amplificati. Con la coppia di primer F4-R5 è stata verificata la presenza/assenza dell'esone 4A, con F4-R7 la presenza/assenza dell'esone 6 e con F4-R9, oltre a mettere in evidenza la presenza o meno dell'esone 6, è stata analizzata anche l'eventuale presenza dell'esone 8.

Utilizzando la coppia di primer F4-R5, è atteso un frammento di 859 bp se presente l'esone 4A, un frammento di 106 bp se assente tale esone; con la coppia di primer F4-R7, i frammenti attesi sono da 402 bp se è presente l'esone 6, da 204 bp se non è presente l'esone 6; infine con la coppia F4-R9, i frammenti attesi sono da 712 se presente l'esone 6, da 514 bp se assente l'esone 6.

I risultati mostrano che, l'esone 4A e l'esone 6, come previsto, non sono presenti nell'mRNA, anche se una banda di DNA molto debole è visibile con i primer F4-R7 di dimensioni (402 bp) compatibile con la presenza dell'esone 6 nel segmento amplificato. Inoltre, come visibile su gel e coerentemente con i dati in letterature, l'esone 8 non è presente (fig. 26A).

Le isoforme canoniche del gene MAPT

Isoforme di tau presenti

Per valutare quali isoforme siano presenti nelle cellule SK-N-BE e in quali quantità relative, sono state utilizzate coppie di primer posizionate lungo il trascritto di MAPT in posizione tale da comprendere gli esoni 2, 3 e 10. Sono state utilizzate due coppie di primer, F1-R11 ed F1-R13, che consentono, in base alla dimensione dei frammenti amplificati, di valutare la presenza delle isoforme canoniche 2N4R, 2N3R, 1N4R, 1N3R, 0N4R e 0N3R (tab. 7).

Tabella 7. Presenza/assenza delle isoforme canoniche

Primer	Isoforma	Frammenti attesi (bp)	Frammenti osservati	
			SK-N-BE proliferative	SK-N-BE differenziate
F1-R11	2N4R	956	==	==
	2N3R	863	==	==
	1N4R	869	==	==
	1N3R	776	si	si
	0N4R	782	si	si
	0N3R	689	si	si
F1-R13	2N4R	1330	==	==
	2N3R	1237	==	==
	1N4R	1243	==	==
	1N3R	1150	si	si
	0N4R	1156	si	si
	0N3R	1063	si	si

I risultati ottenuti hanno mostrato la presenza di due bande con una dimensione corrispondente all'mRNA codificante per le isoforme con le dimensioni più piccole, ossia 0N3R e 0N4R (fig. 26B), mentre gli mRNA codificanti per le isoforme più grandi non sono presenti nella linea cellulare SK-N-BE sia in condizioni proliferative che differenziate. Questi dati sono confermati dall'assenza di segmenti amplificati superiori a 850 bp e 1200 bp. Pertanto, le bande visibili corrispondono alle isoforme 0N3R e 0N4R come evidenziato su

gel elettroforetico (fig. 26B). La presenza dell'isoforma 1N3R (con una dimensione prevista molto vicina a quella dell'isoforma 0N4R e quindi non discriminabile con il presente risultato) è stata esclusa con i risultati ottenuti mediante qRT-PCR (vedi oltre). In sintesi, i nostri dati evidenziano la presenza di due proteine tau di piccole dimensioni, prive delle ripetizioni all'estremità N-terminale (0N) e con 3 o 4 ripetizioni nella regione MBD al C-terminale (3R o 4R), corrispondenti alle isoforme 0N3R e 0N4R di tau. Inoltre, i dati ottenuti nelle cellule SK-N-BE replicative e differenziate dimostrano la presenza delle stesse isoforme in entrambi i tipi di cellule. Nel caso dell'esone 6, leggermente visibile in alcune amplificazioni, si può ipotizzare la presenza in queste cellule di una piccola quantità di forme tronche di Tau, già descritte in letteratura, ma la cui funzione non è ancora chiara.

Quantificazione dei trascritti

Mediante RT-PCR quantitativa sono stati analizzati i livelli di espressione di tau e in particolare delle diverse isoforme presenti nelle cellule SK-N-BE replicative e differenziate. Le analisi di qRT-PCR sono state eseguite utilizzando primer specifici per gli esoni corrispondenti alle ripetizioni 0N, 1N, 2N, 3R e 4R e precisamente le coppie di primer F1/4-R5, F2/4-R4 ed F2/3-R4, specifici rispettivamente per le isoforme 0N, 1N e 2N e le coppie di primer F9/11-R12 e F9/10-R12, specifiche per le isoforme 3R e 4R (tab. 3). Come gene di riferimento è stato utilizzato *ACTB*.

I risultati ottenuti hanno dimostrato la presenza delle ripetizioni 0N e 3R. Le altre (1N, 2N e 4R) sono presenti in quantità relative molto basse. Inoltre, le ripetizioni 0N e 3R sono maggiormente espresse nelle cellule differenziate, con un livello di mRNA di circa 10 volte superiore rispetto a quello presente nelle cellule replicative (fig. 27).

Si dimostra pertanto che, l'isoforma 0N3R risulta essere l'isoforma di TAU maggiormente presente nella linea cellulare SK-N-BE sia replicative che differenziate, con un livello crescente nelle cellule differenziate. Questa isoforma, precedentemente rilevata anche in altre linee cellulari di neuroblastoma come le SH-SY5Y e SK-N-SH (Smith et al., 1995), è anche conosciuta come isoforma Tau fetale, essendo l'unica osservata nel cervello fetale (Buée et al., 2000; Bukar Maina et al., 2016). La presenza dell'isoforma 0N3R nelle cellule SK-N-BE replicative o differenziate potrebbe essere spiegata considerando che le caratteristiche di queste cellule sono simili a quelle dei neuroblasti o delle cellule neuronali

precocemente differenziate presenti nel feto. Quindi, possiamo supporre che nel differenziamento delle cellule SK-N-BE il passaggio alle isoforme più lunghe di Tau non avvenga, probabilmente a causa del limitato tempo vitale di queste cellule, e questo differisce dal normale differenziamento neuronale, che è più lungo, come confermato da studi precedenti (Smith et al., 1995).

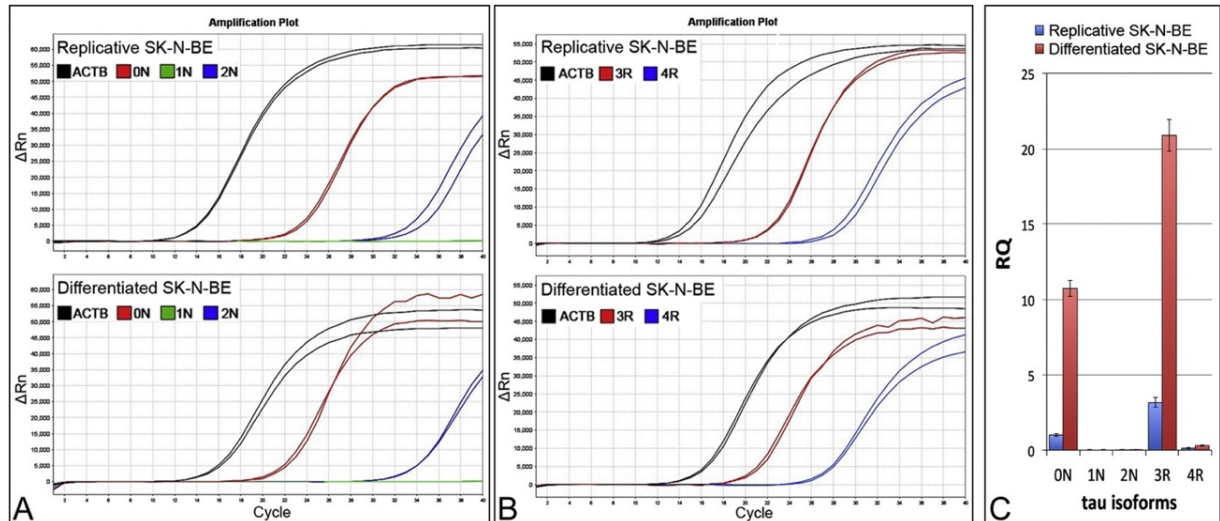


Figura 27. Pattern trascrizionale del gene *MAPT*. (A) e (B) qRT-PCR relativa allo splicing alternativo degli esoni 2-3 (ripetizioni 0N, 1N, 2N) e 10 (ripetizioni 3R, 4R) in cellule SK-N-BE replicative e differenziate. I plots di amplificazione 0N, 1N, 2N, 3R e 4R sono stati ottenuti rispettivamente con le seguenti coppie di primers F1/4-R5, F2/4-R4, F2/3-R4, F9/11-R12 e F9/10-R12. (C) Istogramma generato con valori di $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Le quantificazioni relative sono rappresentate come RQ \pm SE.

La proteina TAU nucleare

———Vista l'importanza del nucleo nei processi cellulari, la localizzazione nucleare di tau fa ipotizzare un suo possibile coinvolgimento in alcuni meccanismi di regolazione genica. La presenza di un elevato numero di siti fosforilabili consente alla proteina tau di acquisire diverse proprietà, tra cui sono stati ipotizzati cambiamenti conformazionali della proteina che potrebbero giocare un ruolo importante nelle interazioni tra tau e gli acidi nucleici. Infatti, nella proteina tau alcune fosforilazioni in siti specifici (Avila, 2009) sembrano determinare la formazione di strutture transitorie (Von Bergen et al., 2005; Jeganathan et al., 2008) che rendono tau in grado di interagire con più proteine diverse e con DNA ed RNA (Wang et al., 2006; Qi et al., 2015). Tuttavia, solo pochi epitopi di Tau sono stati descritti nel nucleo, come l'epitopo Tau-1 che corrisponde alla proteina tau non fosforilata nella regione Pro189/Gly207, l'epitopo AT8 fosforilato nei residui Ser202/Thr205 e l'epitopo AT100, fosforilato in Thr212/Ser214 (Rossi et al., 2008; Hernández-Ortega et al., 2015).

Per comprendere meglio il ruolo della proteina tau a livello del nucleo, sono state eseguite immunolocalizzazioni con anticorpi anti Tau-1 e anticorpi anti AT8, T181 e S262, cioè epitopi di tau fosforilati in siti rilevanti della proteina: nella regione PRD e nella regione MTBD.

Tali esperimenti sono stati condotti sulla linea cellulare SK-N-BE sia nello stato proliferativo che differenziato. Oltre che con tali cellule i suddetti epitopi sono stati localizzati in altri tipi cellulari quale la coltura primaria di linfociti da sangue periferico e in sezioni di tessuto cerebrale umano della regione ippocampale a varie età (cervello fetale, di individui giovani, adulti, senili) e a vari stadi della malattia di Alzheimer (ADI, II, III, IV).

Tau-1 nelle cellule SK-N-BE

L'epitopo Tau-1, che corrisponde alla regione Pro189/Gly207 non fosforilata della proteina tau, è stato localizzato nelle cellule di neuroblastoma umano SK-N-BE, sia nella forma replicativa che in quella differenziata. Questa linea cellulare, come già evidenziato, rappresenta un modello *in vitro* molto interessante in quanto il differenziamento con acido retinoico di tali cellule può essere assimilato al differenziamento *in vivo* delle cellule neuronali, dai neuroblasti (corrispondenti alle cellule SK-N-BE replicative) ai neuroni

differenziati (corrispondenti alle cellule SK-N-BE differenziate dopo trattamento con acido retinoico per 12 giorni).

I risultati ottenuti utilizzando l'anticorpo anti-Tau-1 hanno mostrato una specifica localizzazione nucleolare di tale epitopo, sia nelle cellule replicative che in quelle differenziate (fig. 28). Tau-1 è stato osservato in entrambe le tipologie cellulari, ma con specificità differente.

Nelle cellule replicative, si presenta associato a piccoli segnali localizzati nello spazio nucleolare, lontano dall'eterocromatina periferica nucleolare (fig. 28). Più precisamente, circa il 90% dei nuclei analizzati mostra da 8 a 12 segnali fluorescenti (8%, 24%, 39%, 15% e 4% di nuclei con 8, 9, 10, 11 o 12 segnali fluorescenti, rispettivamente), mentre il restante 10% dei nuclei mostra meno di 8 segnali. Anche nelle cellule differenziate, Tau-1 si presenta con segnali specifici nel nucleolo, ma a differenza di quanto riscontrato nelle cellule replicative, si rilevano dei segnali di dimensioni maggiori nella parte interna dello spazio nucleolare, lontano dalla periferia nucleolare (fig. 28). In questo caso circa il 95% dei nuclei analizzati mostra da 2 a 6 segnali fluorescenti (6%, 14%, 30%, 36% e 9% di nuclei con 2, 3, 4, 5 o 6 segnali, rispettivamente), il restante 5 % ha mostrato solo uno o nessun segnale fluorescente. Quindi, durante il differenziamento sembra che avvenga una aggregazione di proteine tau identificate con l'anticorpo anti Tau-1.

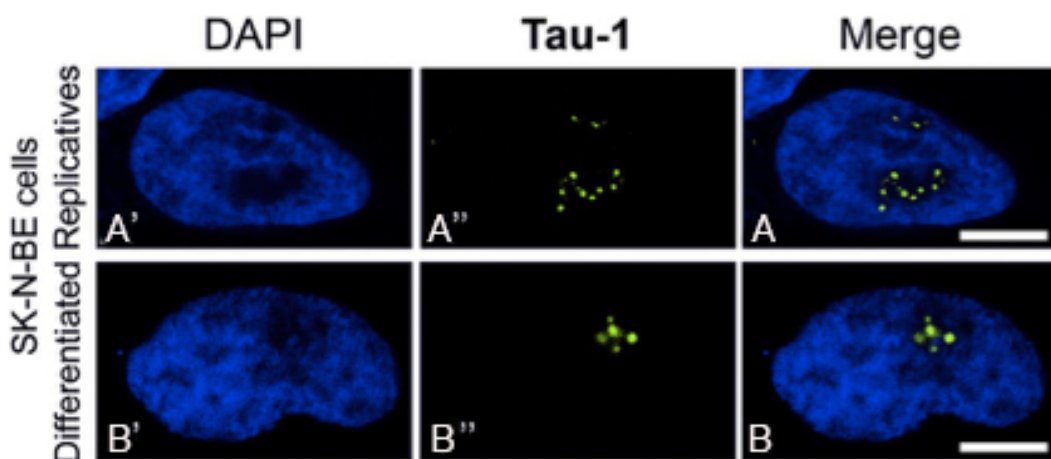


Figura 28. Localizzazione dell'epitopo Tau-1 nelle cellule SK-N-BE replicative e differenziate. (A) e (B) mostrano la localizzazione di Tau-1 nelle cellule replicative, con piccoli segnali localizzati nello spazio nucleolare e differenziate, in cui si rilevano segnali di dimensioni maggiori nella parte interna del nucleolo. In (A') e (B') vengono mostrati i nuclei con la colorazione DAPI (blu). (A'') e (B'') mostrano rispettivamente i segnali di IF presenti negli stessi nuclei AeB (verde). Barre di scala: 5 μ m.

AT8 nelle cellule SK-N-BE

La localizzazione dell'epitopo AT8 nelle cellule SK-N-BE nello stato sia replicativo che differenziato, è stata ottenuta mediante esperimenti di immunofluorescenza utilizzando l'anticorpo monoclonale AT8 che riconosce la regione della proteina TAU con fosforilazione nei residui Ser202/Thr205 (fig. 29).

I dati ottenuti mostrano che, nelle cellule replicative l'epitopo AT8 non è stato rilevato né a livello nucleare né a livello nucleolare (fig. 29). Nelle cellule differenziate invece, sono stati osservati segnali specifici sotto forma di una colorazione uniforme in tutta la regione nucleolare (fig. 29). Pertanto, la proteina Tau è presente nel nucleolo delle cellule SK-N-BE replicative e differenziate, ma con uno schema diverso a seconda dello stato di fosforilazione dei residui Ser202/Thr205. In effetti, è stato rilevato un cambiamento radicale nella distribuzione del segnale durante il differenziamento, con AT8 che appare solo nelle cellule neuronali differenziate.

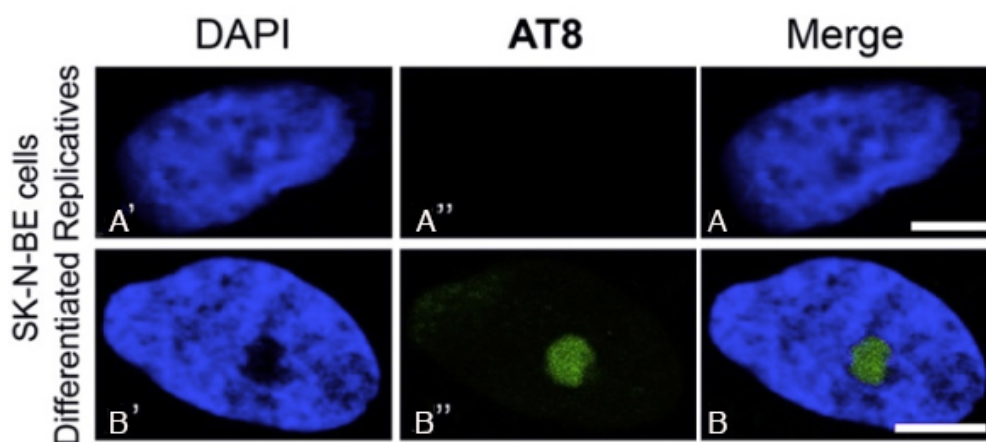


Figura 29. Localizzazione dell'epitopi AT8 nelle cellule SK-N-BE replicative e differenziate. In (C) e (D) è mostrata la localizzazione dell'epitopo AT8 nelle cellule replicative e differenziate; nelle proliferative non si rilevano segnali di IF, nelle differenziate si osservano segnali, all'interno del nucleolo, uniformemente distribuiti. In (C') e (D') vengono mostrati i nuclei con la colorazione DAPI (blu). (C'') e (D'') mostrano rispettivamente i segnali di IF presenti negli stessi nuclei C e D (verde). Barre di scala: 5 μ m.

Tau-1/AT8 e l'attività trascrizionale nel nucleolo

Per meglio definire la localizzazione nucleolare degli epitopi Tau-1 e AT8, sono stati effettuati esperimenti di immunofluorescenza dual color con UBTF, marcatore specifico di attività nucleolare avente un ruolo fondamentale nella trascrizione dell'rDNA. L'utilizzo dell'anticorpo anti-UBTF ha messo in evidenza che, Tau-1 colocalizza con il fattore trascrizionale UBTF sia nelle cellule SK-N-BE replicative che differenziate.

Vista la colocalizzazione della proteina Tau con il fattore trascrizionale UBTF, il cui ruolo è quello di attivare la PolI e mantenere lo stato eterocromatinico aperto dell'rDNA attivo legandosi alle sequenze ripetute di rDNA durante tutto il ciclo cellulare, si potrebbe ipotizzare una possibile interazione di Tau-1 con l'rDNA durante il ciclo cellulare e visto quanto rilevato nelle cellule differenziate, considerando il ruolo centrale di UBTF nella trascrizione del rDNA, è possibile ipotizzare che Tau-1 possa essere coinvolto nell'organizzazione e/o espressione dei geni attivi dell'rRNA.

Sulla base di questa ipotesi e sapendo che nelle cellule replicative il nucleolo presenta un'elevata attività trascrizionale, mentre in quelle differenziate l'attività trascrizionale è nettamente diminuita, è stata analizzata la localizzazione degli epitopi Tau-1 e AT8 mediante immunofluorescenza in cellule SK-N-BE replicative dove è stata inibita l'attività trascrizionale mediante trattamento con Act-D.

L'IF ha mostrato che Tau-1 è visibile all'interno del nucleolo, ma si presenta come piccoli segnali fluorescenti di numero ridotto e localizzati alla periferia nucleolare rispetto a quanto evidenziato nelle cellule replicative, ma molto simile anche se non identico alla distribuzione evidenziata nelle cellule differenziate. Questo sta ad indicare che il trattamento con Act-D ha comportato l'aggregazione con conseguente rilocalizzazione dell'epitopo analizzato e quanto rilevato concorda con i dati di letteratura che dimostrano che l'Act-D induce la riorganizzazione della struttura nucleolare con formazione dei cosiddetti "*caps nucleolari*". Questo dato è emerso su circa l'88% dei nuclei analizzati, in cui erano presenti da 4 a 6 segnali fluorescenti (27%, 46% e 15% di nuclei con 4, 5 e 6 segnali, rispettivamente), mentre solo il 9% dei nuclei mostrava dei segnali di numero inferiore a 4 e solo il 3% di numero superiore a 6.

La rilocalizzazione della proteina tau concorda con quanto accade alla cellula a seguito del blocco della trascrizione, quindi alla riorganizzazione della cromatina a seguito del differenziamento della cellula, in cui si ha la fusione dei piccoli nucleoli presenti nelle cellule in replicazione, in un unico nucleolo più grande (Floutsakou et al., 2013; McStay, 2016). Questo è stato confermato anche tramite esperimenti di IFI dual color con UBTF, in cui è emersa la colocalizzazione della stessa tau con il fattore di trascrizione nucleolare in maniera sovrapponibile e dunque ancora più specifica a livello dell'eterocromatina perinucleolare (fig. 30). Pertanto, sulla base dei dati di IFI dual color ottenuti, Tau-1 sembra molto probabile il coinvolgimento dell'epitopo Tau-1 con l'rDNA trascrizionalmente attivo (fig. 30).

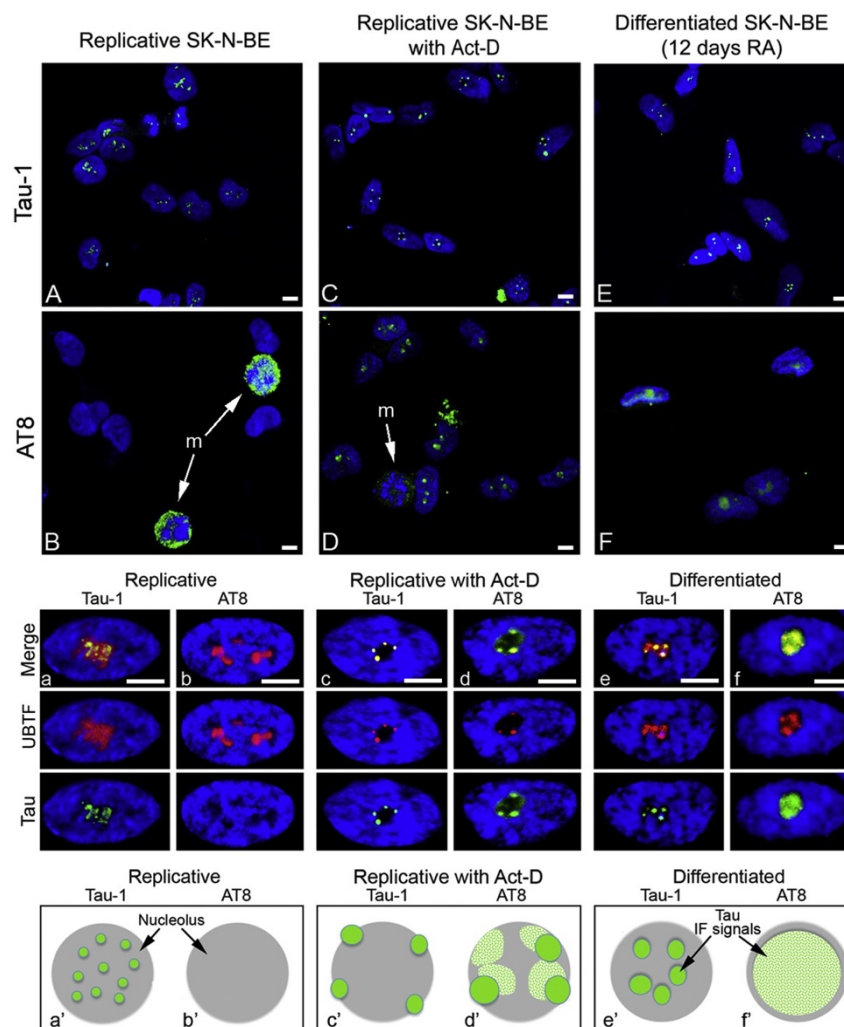


Figura 30. Distribuzione della proteina tau a seguito del blocco trascrizionale indotto da Act-D in cellule SK-N-BE. Distribuzione nucleolare degli epitopi Tau-1 ed AT8 (segnali verdi) dopo 1 h di esposizione ad Act-D (C, D) rispetto alle cellule replicative (A, B) e differenziate (E, F). In (B) sono visibili due metafasi (m) con una grande quantità di AT8; in (D) è visibile una metafase (m) con una bassa quantità di AT8. Le immagini da (a) ad (f) mostrano i nuclei ad un maggiore ingrandimento, da (a') ad (f') rappresentazione schematica della distribuzione nucleolare degli epitopi di Tau nelle condizioni cellulari mostrate da (a) ad (f).

Durante la divisione cellulare, la trascrizione dell'rDNA da parte della RNA Pol I (pol I) cessa e le NOR attive possono essere osservate come costrizioni secondarie, sui cromosomi in metafase. UBTF in metafase rimane associato alle ripetizioni di rDNA attive fungendo da marcatore mitotico e sito di legame per il macchinario di trascrizione della Pol I (van Sluis and McStay, 2017; Nemeth and Grummt, 2018). Sulla base di ciò, e visti i risultati fin ora ottenuti, l'epitopo Tau-1 è stato anche analizzato a livello delle metafasi sia nelle cellule replicative che delle cellule replicative trattate con Act-D (fig. 31). I risultati ottenuti mediante esperimenti IF e IF dual color con UBTF, hanno mostrato la presenza di tale epitopo non fosforilato nei cromosomi metafasici in entrambe le tipologie cellulari, cioè replicative e dopo trattamento con Act-D; inoltre risulta ancora evidente la colocalizzazione con UBTF (fig. 31). Durante l'anafase, i segnali risultano essere presenti anche nei due gruppi cromosomici separati (fig. 31). Risulta pertanto ancora più evidente un'interazione diretta o indiretta di Tau-1 con l'rDNA durante l'intero ciclo cellulare.

AT8, nelle cellule esposte ad Act-D, è stato rilevato analogamente a Tau-1, distribuito con grandi segnali alla periferia nucleolare, in gran parte colocalizzanti con UBTF (fig. 30). Il numero elevato (circa l'85%) dei nuclei analizzati ha mostrato da 3 a 5 segnali fluorescenti (12%, 31% e 42% dei nuclei con 3, 4 o 5 segnali, rispettivamente). I restanti nuclei hanno mostrato segnali di IF <3 (9%) o > 5 (6%). Inoltre, è stato osservato un segnale diffuso che occupa parte della regione nucleolare attorno ai segnali più grandi (fig. 30). Pertanto, la distribuzione nucleolare di AT8, nelle cellule esposte ad Act-D, è molto diversa rispetto all'assenza di segnali delle cellule replicative e rispetto al segnale diffuso osservato nelle cellule differenziate, mettendo in evidenza così una possibile correlazione con il silenziamento dell'rDNA. Questo ruolo è stato confermato anche dalla colocalizzazione di AT8 con UBTF (e indirettamente con Tau-1) nella periferia nucleolare delle cellule esposte ad Act-D.

L'epitopo AT8 è stato anche analizzato a livello delle metafasi mostrando una particolare distribuzione. I risultati ottenuti mostrano infatti che nelle cellule replicative, AT8 si localizza attorno ai cromosomi metafasici e anafasici (fig. 31), con una distribuzione del segnale che occupa l'intera cellula e non è stata osservata alcuna colocalizzazione con UBTF. Viene invece evidenziato che alla fine della mitosi, AT8 è completamente scomparso dalla cellula, con la sua assenza evidente nei nuclei in interfase

(fig. 31). Invece, l'esposizione Act-D delle cellule replicative ha portato ad una grande diminuzione dell'epitopo AT8 attorno ai cromosomi mitotici, con solo un segnale molto debole visibile e un suo concomitante aumento a livello nucleolare (fig. 31).

Considerando che AT8 si trova attorno ai cromosomi mitotici (nelle cellule replicative) e nel nucleolo di cellule con attività trascrizionale bassa o nulla (cellule differenziate o indotte da Act-D), si può ipotizzare che AT8, nelle cellule di neuroblastoma, rileva due diversi tipi della più piccola isoforma di Tau ON3R, caratterizzata da diversi pattern di fosforilazione, con una fosforilazione nei residui Ser202 / Thr205, e gli altri in diversi siti non rilevati: un tipo è coinvolto nella mitosi e l'altro in un processo possibilmente correlato all'inattivazione dei geni dell'rRNA.

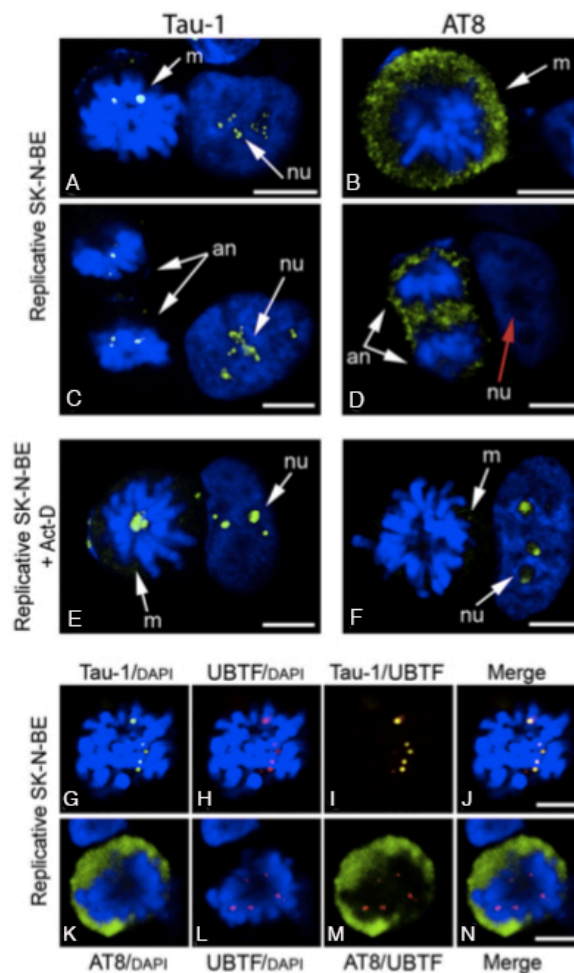


Figura 31. Immunolocalizzazione degli epitopi Tau-1 e AT8 durante la mitosi in cellule SK-N-BE. In (A) e (C) evidente l'epitopo Tau-1 nelle cellule replicative a livello delle metafasi e delle anafasi. In (B) e (D) distribuzione dell'epitopo AT8 nelle metafasi e anafasi delle cellule proliferative. (E) e (F) Diversa distribuzione degli epitopi Tau-1 e AT8, nelle cellule replicative dopo esposizione ad Act-D. Da (G) a (J) localizzazione di Tau-1 (segnali verdi) rispetto ad UBTF (segnali rossi) nelle metafasi di cellule replicative in cui è evidente la loro colocalizzazione; da (K) a (N) localizzazione di AT8 (segnali verdi) rispetto ad UBTF (segnali rossi) nelle metafasi di cellule replicative. Nuclei e cromosomi sono stati colorati con DAPI (blu). La freccia rossa (D) indica il nucleolo (nu) senza AT8. nu: nucleolo; m: metafase; an: anafase. Barre di scala: 5 μ m.

Localizzazione di altre forme fosforilate di Tau

Nelle cellule SK-N-BE sono stati analizzati altri epitopi con fosforilazioni in siti aminoacidici presenti nelle regioni PRD e MTBD. Per gli epitopi analizzati non è stata osservata alcuna differenza tra le cellule replicative e quelle differenziate (fig. 32). Non sono quindi stati analizzati ulteriormente.

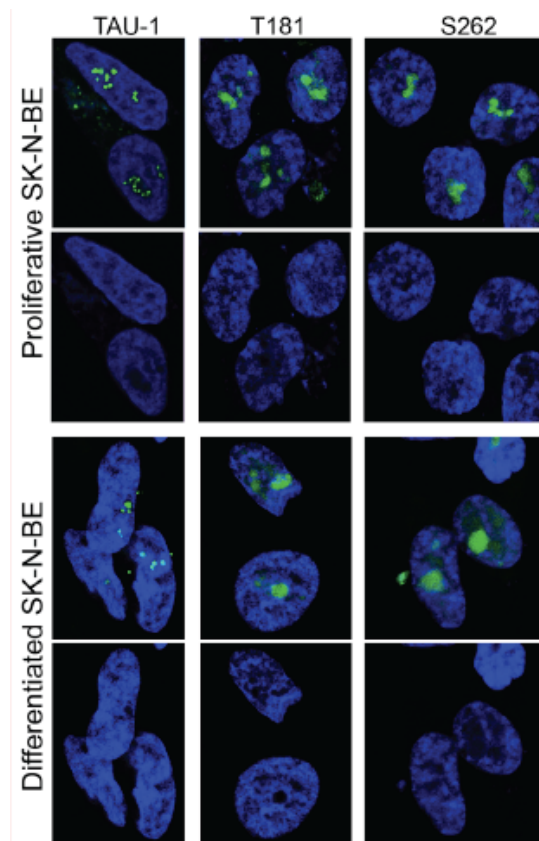


Figura 32. Immunolocalizzazione degli epitopi T181 e S262 rispetto a TAU-1 in cellule SK-N-BE replicative e differenziate. Pannello superiore: localizzazione di T181 e S262 all'interno della regione nucleolare con segnale uniformemente distribuito, rispetto alla distribuzione nucleolare di TAU-1, in cellule SK-N-BE replicative. Pannello inferiore: localizzazione in cellule SK-N-BE differenziate di T181 e S262 rispetto a TAU-1 in cui è evidente una distribuzione simile a quanto visto sopra. Nuclei colorati con DAPI.

Tau nucleare nei linfociti umani

I linfociti umani rappresentano cellule non replicative che presentano un piccolo nucleolo ed hanno un'attività trascrizionale molto bassa, mentre quelli posti in coltura con l'aggiunta di PHA (fitoemoagglutinina), sostanza che induce l'attività mitotica, rende tali cellule replicative, con un'elevata attività trascrizionale e con più nucleoli di dimensioni maggiori. Dati di letteratura dimostrano infatti che i geni per il rDNA mostrano livelli di trascrizione elevati nei linfociti indotti da PHA rispetto a quelli non indotti (Torelli et al., 1968; Dauphinais, 1981). Pertanto, si è ritenuto opportuno confrontare i dati sull'epitopo Tau-1 ottenuti sulle cellule SK-N-BE replicative e differenziate con i linfociti indotti da PHA e non indotti, prendendo in considerazione l'attività trascrizionale e la progressione del ciclo cellulare (fig. 33).

Innanzitutto, è stata valutata l'attività trascrizionale dei linfociti umani dall'assenza o presenza della proteina fibrillarina, considerato un marker specifico della componente fibrillare densa coinvolto nel processamento del pre-rRNA, nei linfociti indotti/non indotti da PHA. Esperimenti di immunofluorescenza hanno messo in evidenza la sua presenza nei linfociti indotti da PHA mentre la sua assenza in quelli non indotti, come ci si aspettava. Questi dati sono stati altresì confermati mediante qRT-PCR in cui è stato valutato il livello trascrizionale del gene della fibrillarina in ambedue le tipologie cellulari, ed il cui risultato ha mostrato un'espressione significativamente più elevata del gene della FBL nei linfociti indotti da PHA (fig. 33).

A questo punto è stata analizzata la localizzazione dell'epitopo Tau-1 su entrambe le tipologie cellulari. Nei linfociti senza stimolazione da PHA, il segnale Tau-1 è stato rilevato come un unico grande segnale in corrispondenza del piccolo nucleolo presente in queste cellule. Nei linfociti indotti da PHA, l'anticorpo Tau-1 ha rilevato un certo numero di segnali all'interno del nucleolo, che in queste cellule è molto grande e trascrizionalmente attivo (fig. 33). Più precisamente, circa il 95% dei nuclei analizzati mostra da 7 a 14 segnali fluorescenti (12%, 30%, 26% e 12% dei nuclei con 9, 10, 11 o 12 segnali, rispettivamente), il rimanente 5% circa dei nuclei ha mostrato un numero < 7 di segnali. Anche in queste cellule la localizzazione nucleolare di questo epitopo è stata confermata mediante IFI dual color con UBTF, ed è emerso che Tau-1 ed UBTF colocalizzano sia nel caso dei linfociti indotti da PHA che in linfociti non indotti (fig. 33, pannelli inferiori).

Tuttavia, si può affermare che i linfociti che si trovano in uno stato non replicativo, con una bassa attività trascrizionale e un piccolo nucleolo, presentano una distribuzione dell'epitopo Tau-1 molto simile a quanto descritto per le cellule SK-N-BE differenziate. Dopo l'attivazione del ciclo cellulare mediante induzione da PHA aumenta l'attività trascrizionale, il numero di nucleoli, la loro dimensione e i segnali di Tau-1 vengono rilevati in maniera equivalente a quanto osservato nelle cellule SK-N-BE replicative.

I linfociti umani e le cellule SK-N-BE, risultano dunque avere attività trascrizionale simile e stesso pattern di localizzazione dell'epitopo Tau-1, indicando un possibile ruolo di quest'ultimo correlato all'espressione del rRNA e all'attività nucleolare.

Nei linfociti senza stimolazione da PHA, AT8 risulta essere presente nel nucleolo con una distribuzione simile a Tau-1 e colocalizzante con UBTF, ma sono stati anche rilevati dei segnali nel citoplasma (fig. 33). Nei linfociti indotti da PHA invece i segnali sono completamente scomparsi dal nucleolo, questo confermato dalla sola presenza di UBTF all'interno di questa regione, probabilmente a causa dell'attivazione di un numero più elevato di geni per gli rRNA; mentre, rimangono evidenti pochi segnali presenti nel citoplasma (non rilevati in tutte le cellule, ma solo in circa il 20% di essi) (**fig. 35**). Così, linfociti e cellule SK-N-BE dotate di attività trascrizionale nucleolare comparabile mostrano lo stesso pattern di localizzazione di AT8, indicando un possibile ruolo generale della proteina Tau correlato all'espressione di rRNA e all'attività e all'attività nucleolare.

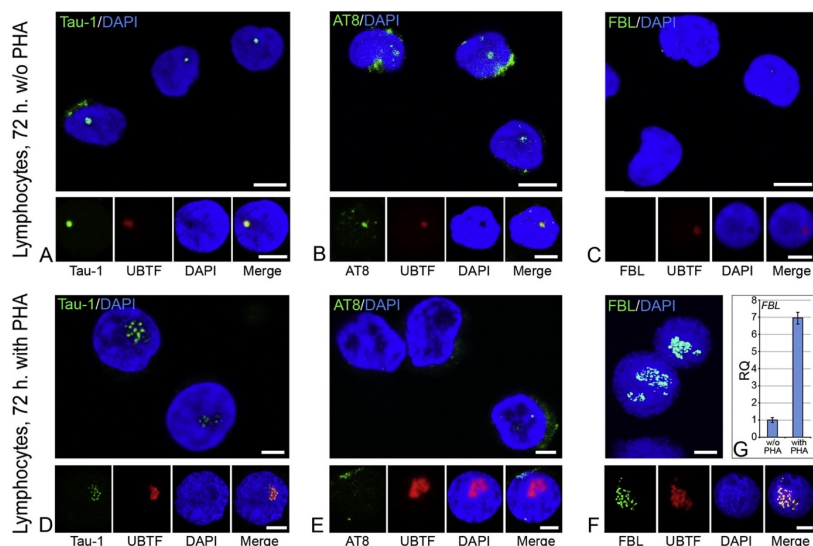


Figura 33. La proteina tau nei linfociti umani. Immunolocalizzazione degli epitopi Tau-1 e AT8 (segnali verdi) nei linfociti umani con (A, B) e senza (D, E) PHA. Rilevazione della fibrillina inclusa come controllo per valutare l'attività trascrizionale delle cellule indotte da PHA (F) e non indotte (C). Nuclei colorati con DAPI (blu). Nella parte inferiore di ciascun pannello, IF dual-color con UBTF (segnali rossi) e Tau-1/AT8/FBL (segnali verdi). (G) Livello trascrizionale di FBL nei linfociti con o senza PHA ottenuto da qRT-PCR. Le QR sono rappresentate come RQ \pm SE PHA: fitoemagglutina; FBL: fibrillarina; UBTF: fattore di trascrizione di legame a monte. Barre di scala: 5 μ m.

Quantizzazione della proteina Tau

Gli epitopi Tau-1 e AT8 sono stati analizzati mediante western blot con omogenati cellulari da cellule SK-N-BE replicative, differenziate e replicative dopo 1 ora di trattamento Act-D. I risultati hanno dimostrato la presenza della proteina Tau con una dimensione corrispondente all'isoforma più piccola 0N3R (fig. 34), come atteso in base ai dati emersi mediante analisi qRT-PCR. L'epitopo AT8, in tutti i casi, è stato rilevato in quantità maggiori rispetto a Tau-1, circa 9 e 11 volte più alto di Tau-1 nelle cellule replicative e differenziate rispettivamente. Nel caso delle cellule replicative trattate con Act-D, questa differenza era ancora più alta, con la quantità di AT8 che era circa 25 volte superiore a Tau-1 (fig. 34). Nelle cellule differenziate e indotte con Act-D, è stato inoltre rilevato un aumento del livello di Tau-1 e AT8 rispetto alle cellule replicative. Più precisamente, le quantità di Tau-1 e AT8 sono aumentate rispettivamente di 2 e 2,5 volte nelle cellule differenziate rispetto a quelle replicative (fig. 34). Nelle cellule indotte da Act-D, rispetto a quelle replicative, il livello crescente di AT8 (circa 3,5 volte superiore) è risultato statisticamente molto significativo (fig. 34), mentre il livello crescente di Tau-1 era statisticamente non significativo (fig. 34). Va sottolineato che Tau totale non aumenta significativamente dopo trattamento con Act-D, in contrasto con l'aumento della quantità osservata nelle cellule differenziate (fig. 34).

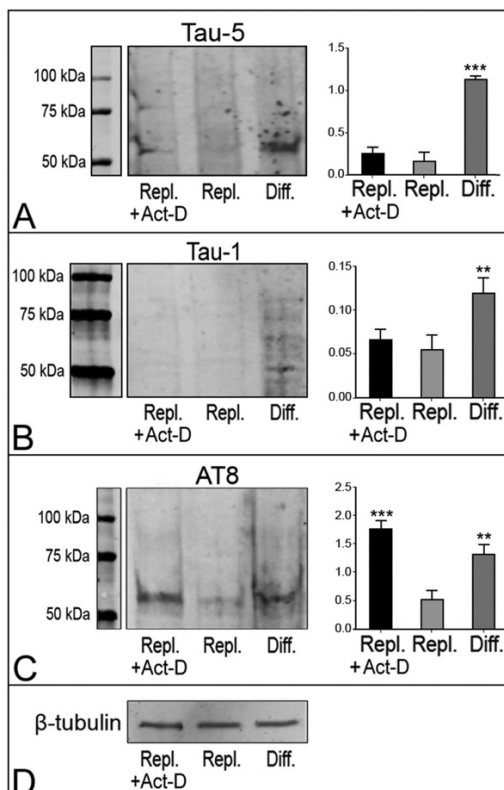


Figura 34. Livello di espressione della proteina Tau. Immunoblots con segnali rilevati dagli anticorpi Tau-5 (A), Tau-1 (B) e AT8 (C) su omogenati cellulari di cellule SK-N-BE replicative (Repl.), differenziate (Diff.) e replicative dopo 1 ora di esposizione ad Act-D (Repl. + Act-D). I grafici a barre mostrano i risultati di tre esperimenti indipendenti. L'analisi densitometrica di ciascuna banda è stata ottenuta mediante l'utilizzo del software ImageJ e i livelli di proteine sono stati espressi come unità arbitrarie ottenute dopo la normalizzazione con β -tubulina (D), che è stata utilizzata come controllo di caricamento. I dati sono espressi come media \pm SE.

Analisi trascrizionale dei geni per gli rRNA nella linea cellulare SK-N-BE

Visto che, come riportato in letteratura (Sanij e Hannan, 2009; Takada e Kurisaki, 2015), la funzionalità nucleolare durante il differenziamento cellulare dovrebbe essere ridotta e visto che gli epitopi Tau-1 ed AT8 analizzati sono stati osservati nel nucleolo e in particolare colocalizzanti con il fattore trascrizionale nucleolare UBTF, sono stati analizzati i livelli di espressione dei geni per gli rRNA nelle cellule SK-N-BE replicative e differenziate (fig. 35).

Mediante qRT-PCR è stata verificata la riduzione dei livelli di espressione dell'rDNA nelle cellule differenziate rispetto alle replicative, utilizzando primers specifici della regione promotore, dello spaziatore esterno ETS e del gene 18S. Precisamente, la regione promotore non viene trascritta e quindi controllo negativo, la regione 18S è presente nel trascritto primario e nei ribosomi quindi rappresenta il controllo positivo, mentre l'ETS essendo una sequenza trascritta ma immediatamente eliminata per ottenere gli rRNA maturi, rappresenta la parte dell'intero cluster genico che consente di valutare i livelli di espressione in tali cellule.

I risultati ottenuti mostrano come atteso che, la regione del sito promotore nt-Pr risulta non espressa, mentre la regione 18S è quella maggiormente espressa. I livelli di espressione relativi alla regione ETS risultano essere ridotti in maniera significativa nelle cellule differenziate rispetto a quelle replicative. Dunque, i risultati ottenuti hanno evidenziato che, nelle cellule differenziate il livello di trascrizione di rDNA è di circa il 30% rispetto alle cellule replicative, confermando così i risultati precedenti su una notevole riduzione dell'attività trascrizionale durante il differenziamento cellulare. È inoltre probabile che la proteina tau intervenga nel differenziamento cellulare contribuendo alla riorganizzazione dell'rDNA e dell'eterocromatina nucleolare modulando l'attività dei geni ribosomiali.

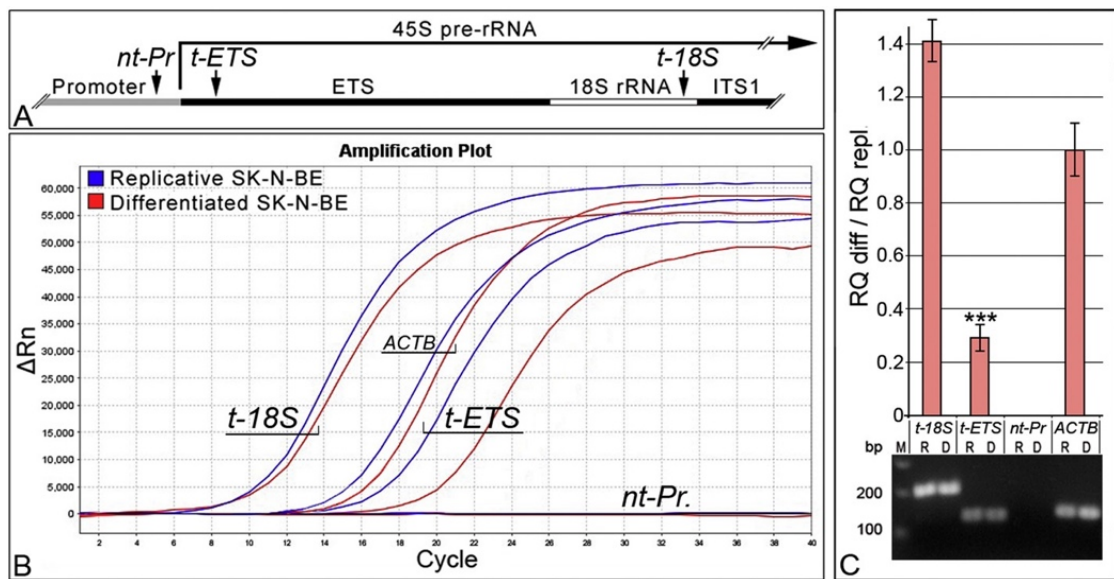


Figura 35. Livelli di espressione del cluster di geni per gli rRNA. (A) Rappresentazione schematica della regione di inizio dell'rDNA, con la posizione (frecche verticali) dei segmenti amplificati utilizzati per valutare il livello trascrizionale dell'rDNA: promotore non trascritto (nt-Pr), ETS trascritto (t-ETS) e gene 18S trascritto (t-18S). (B) Plots di amplificazione qRT-PCR ottenuto con le tre regioni (nt-Pr, t-ETS e t-18S) nelle cellule SK-N-BE replicative e differenziate. ACTB è stato usato come controllo endogeno. (C) Superiore: grafico con il rapporto del livello trascrizionale di rRNA nelle cellule SK-N-BE differenziate rispetto alle cellule replicative. Il valore t-ETS indica il livello trascrizionale drasticamente ridotto dell'rDNA nelle cellule differenziate (***) $p < 0,001$. RQ diff: RQ in cellule differenziate; RQ repl: RQ in cellule replicative; ogni grafico a barre mostra l'RQ \pm SE. In basso: dimensione dei segmenti amplificati verificata dopo qRT-PCR con elettroforesi su gel di agarosio al 2%. R e D: cellule replicative e differenziate; bp: coppie di basi.

La proteina Tau nelle cellule nervose umane

Per cercare di comprendere se i risultati ottenuti con le cellule di neuroblastoma SK-N-BE fossero comparabili con quelli delle cellule nervose del tessuto cerebrale umano, sono stati condotti esperimenti di immunolocalizzazione con gli stessi epitopi utilizzati con le SK-N-BE. Tali esperimenti sono stati condotti su sezioni sottili di tessuto cerebrale umano della regione CA1 dell'ippocampo a varie età, dal cervello fetale al cervello senile. Sono anche state utilizzate sezioni di cervello di individui affetti dalla malattia di Alzheimer a vari stadi di gravità, poiché tau è una delle proteine maggiormente coinvolte nella manifestazione di tale malattia.

La proteina tau infatti, non solo è stata correlata all'AD, ma anche al cancro, ed è stato suggerito che l'invecchiamento possa attivare percorsi simili in entrambe le patologie (Souter and Lee, 2009). È noto che l'invecchiamento nucleare è accompagnato da danno alla cromatina e instabilità genomica associata a cambiamenti nella struttura della cromatina, come la perdita di eterocromatina (Pegoraro and Misteli, 2009).

Immunolocalizzazioni con anticorpi diretti verso differenti epitopi fosforilati di tau correlati con la formazione dei NFT nell'Alzheimer così come con la forma non fosforilata Tau-1, sono state effettuate per analizzare la distribuzione nucleare delle diverse forme di Tau nelle cellule neuronali.

Localizzazione dell'epitopo TAU-1

L'epitopo Tau-1 è stato analizzato nei nuclei delle cellule nervose piramidali dell'ippocampo umano, visto che tale regione cerebrale e in particolare tale tipologia cellulare risultano essere maggiormente colpiti dalle lesioni iniziali caratteristiche dell'Alzheimer.

Nelle sezioni di tessuto analizzate quali feto, giovane (20-30 anni), senile (63 anni), AD1 ed AD4, viene messo in evidenza un singolo nucleolo che appare chiaramente visibile nei nuclei colorati con DAPI e caratterizzato da blocchi di eterocromatina ben evidenziati da una colorazione più intensa di aspetto sferoidale (fig. 36). I risultati di IF mostrano la presenza di Tau-1 a livello nucleolare nelle sezioni di cervello di tutte le età analizzate e nei

casi di AD. Nell'AD-1, cioè il primo stadio della malattia, i segnali di Tau-1 sembrano essere quantitativamente di meno rispetto agli altri casi analizzati (fig. 36).

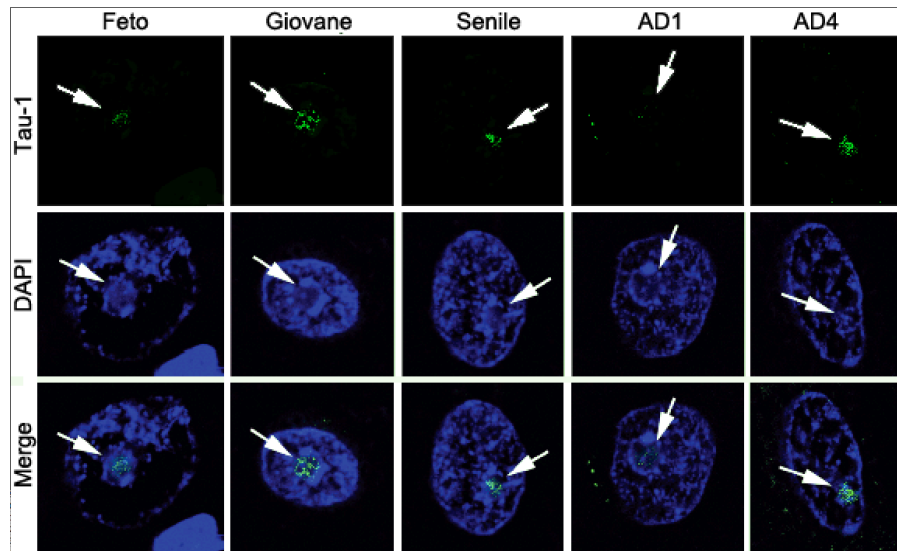


Figura 36. Immunolocalizzazione dell'epitopo Tau-1 in cellule nervose piramidali di ippocampo di individui con differente età e stadio AD. Evidente la localizzazione nucleolare di TAU-1 in tutti i casi analizzati con AD1 in cui il segnale è particolarmente debole. Nucleo colorati con DAPI in cui è mostrato (frecce) il nucleolo maturo circondato da evidenti blocchi di eterocromatina.

Gli altri epitopi analizzati (S262, T181), eccetto AT8, mostrano un elevato livello di segnale nelle sezioni di cervello di tutte le età analizzate, compreso i casi di AD (fig. 37).

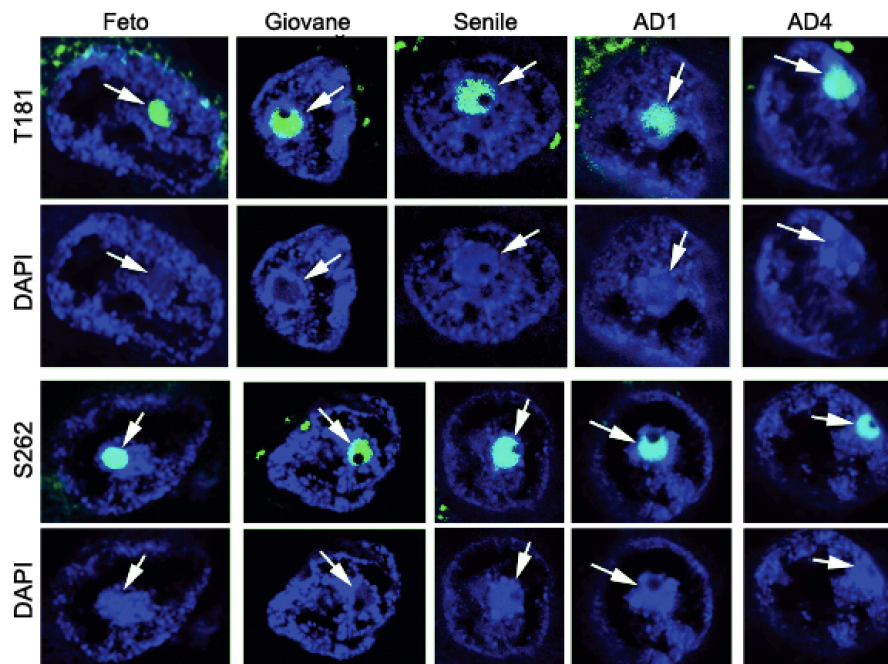


Figura 37. Immunolocalizzazione degli epitopi fosforilati T181 e S262 in cellule nervose piramidali di ippocampo di individui con differente età e stadio AD. I due epitopi analizzati mostrano evidenti segnali a livello nucleolare in tutti i casi analizzati. Nuclei colorati con DAPI (blu).

Localizzazione dell'epitopo AT8

Immunolocalizzazioni dell'epitopo AT8, analizzato anch'esso nelle sezioni di tessuto cerebrale quali feto, giovane, senile, ADI e AD4, hanno mostrato risultati diversi rispetto a quanto emerso per Tau-1. AT8 mostra un aumento di segnale nel nucleolo dal cervello fetale al cervello di individui giovani. La presenza di AT8 diminuisce quindi dal cervello giovane al cervello senile compreso il cervello di individui con AD (fig. 38). L'analisi delle cellule nervose della regione CA1 ha mostrato che il numero di cellule con l'epitopo AT8 nel nucleolo aumenta fino al cervello giovane per poi diminuire fino al cervello senile. Nel cervello di individui con AD la percentuale di cellule con AT8 decresce leggermente per arrivare al valore minimo nelle cellule AD4 (cervello di individui AD al 4° stadio di gravità) (fig. 39).

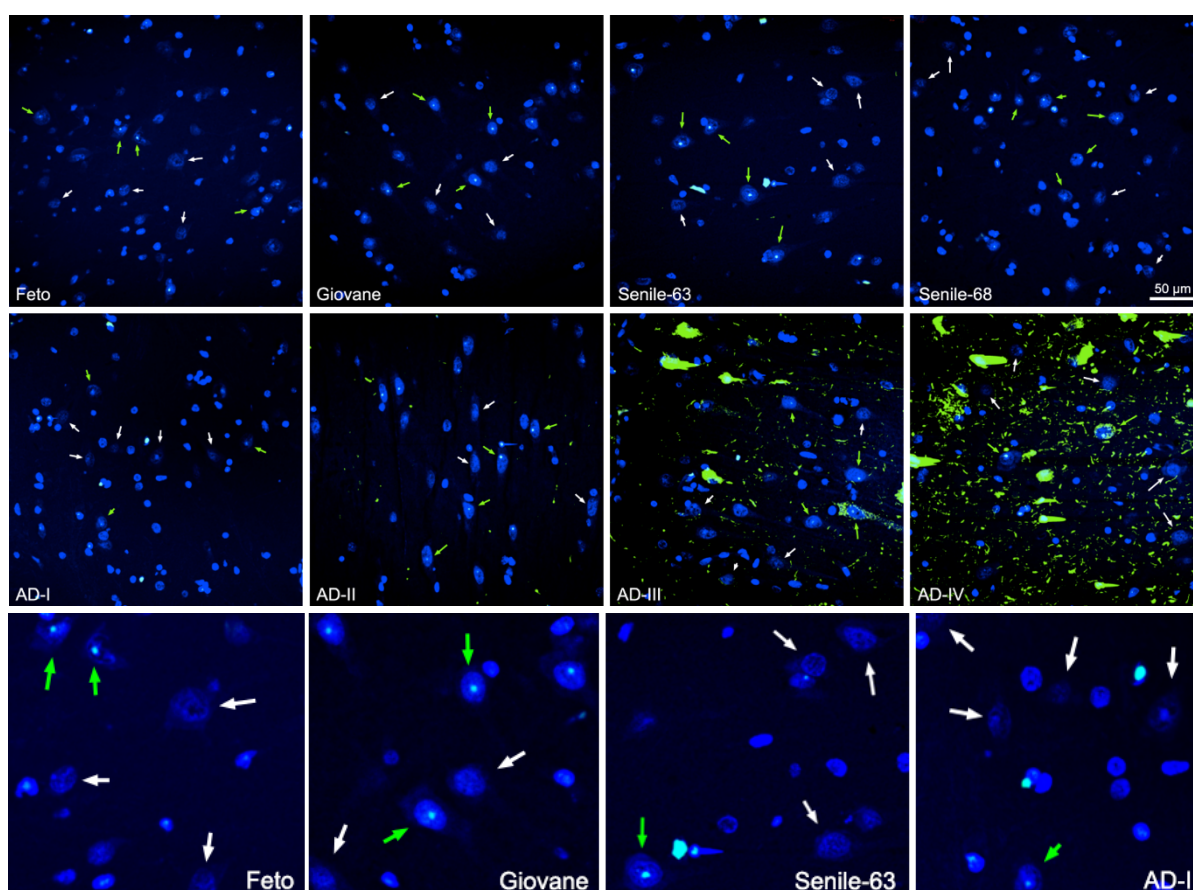


Figura 38. Immunolocalizzazione dell'epitopo AT8 in cellule nervose di individui con differente età e stadio AD. I segnali di IF sono evidenti in tutti i casi analizzati, con un aumento di intensità del segnale nel giovane ed una diminuzione a livello del senile e dei casi AD. Nell'ultima line, ingrandimento dei primi quattro pannelli, in cui è evidente la graduale diminuzione del numero di cellule nervose con AT8 analizzate.

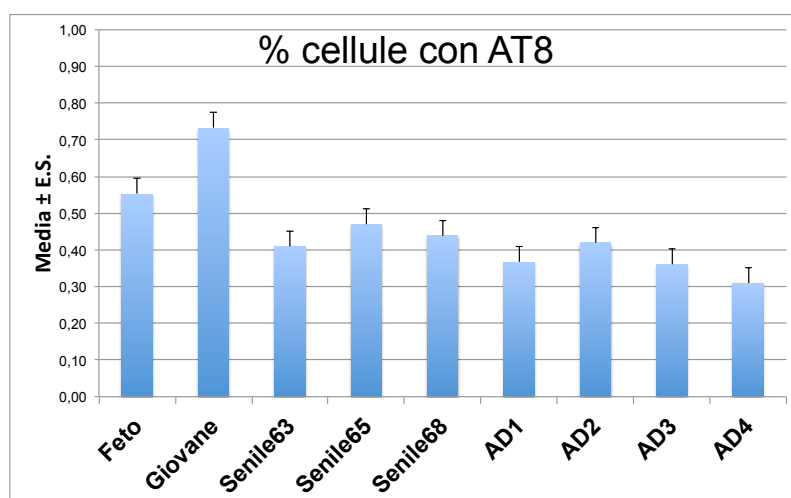


Figura 39. Numero di cellule con AT8. Rapporto tra il numero di cellule neuronali positive per AT8 rispetto al totale di cellule neuronali presenti in un campo di 400x400 μm .

Localizzazione dell'epitopo AT100

Sulla base di studi precedenti in cui è stato dimostrato che una forma fosforilata di tau sui residui Thr212 / Ser214, denominata AT100, è presente nei nuclei di cellule di topo e di cervello umano (Gartner et al., 1998; Hernández-Ortega et al., 2015), si è ritenuto necessario approfondire gli studi su tale epitopo mediante esperimenti di immunolocalizzazione in cellule nervose di cervello di individui di varia età.

La distribuzione cellulare di AT100 è stata analizzata su due diversi tipi di cellule umane nei diversi stadi dell'invecchiamento finora presi in considerazione quali feto, giovane e senile: i neuroni piramidali dalla regione CA1 e i neuroni granulari dal giro dentato (GD). Abbiamo anche analizzato la distribuzione di AT100 nei neuroni piramidali dalla regione CA1 di soggetti con AD allo stadio I e allo stadio IV.

Nei neuroni piramidali della regione CA1 dell'ippocampo è emerso che AT100 co-localizza con la colorazione DAPI più intensa che corrisponde alla cromatina più compatta presente prevalentemente alla periferia del nucleo e adiacente alla membrana nucleare. Tale compartimento della cromatina corrisponde generalmente al DNA più povero in GC. AT100 è stato inoltre osservato nel nucleolo, dove colocalizza con UBTF (fig. 42). La cosa interessante che è stata osservata è l'aumento progressivo, con l'aumentare dell'età del cervello analizzato, di AT100 nel nucleolo dei neuroni della regione CA1. Anche nei primi stadi di AD è stato osservato l'aumento della quantità di AT100, che di contro diminuisce repentinamente negli stadi più avanzati dell'AD, non essendo rilevabile nelle cellule AD-IV.

Si può dunque affermare che, la presenza di AT100 nel nucleo aumenta con l'invecchiamento raggiungendo i livelli più alti nei neuroni senili. L'aumento di AT100, è statisticamente significativa considerando la quantità di proteine nel nucleo (fig. 40) e considerando il numero di cellule contenenti AT100 (fig. 40). Tuttavia, come è stato precedentemente descritto (Hernández-Ortega et al., 2015), nei neuroni dei soggetti affetti da AD si verificano cambiamenti significativi della localizzazione nucleare di AT100 che scompaiono progressivamente dallo stadio iniziale. Nelle fasi più avanzate, come in ADIV, il segnale AT100 scompare dalla cromatina nucleare e nucleolare, in concomitanza con la sua comparsa nel citoplasma e formazione dei NFTs, anche se vi sono neuroni in cui manca AT100 nel nucleo e nel citoplasma (fig. 42).

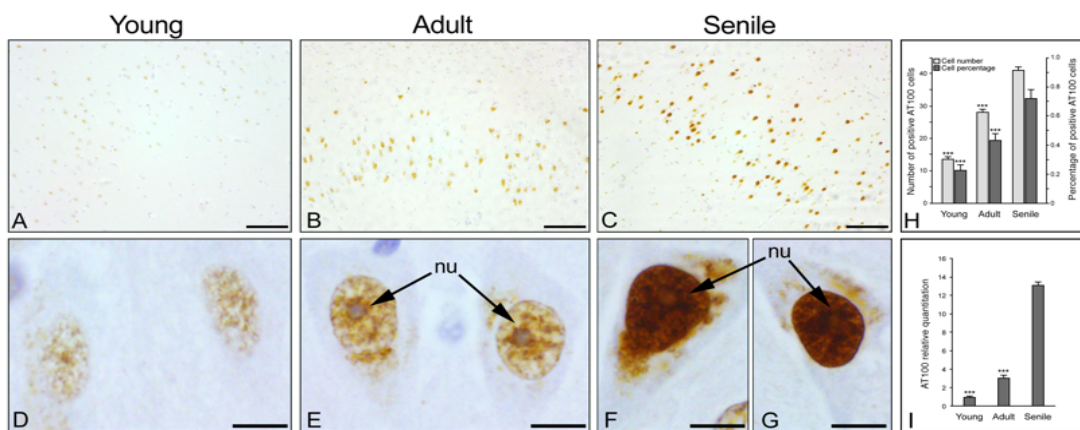


Figura 40. Analisi di immunistochemica della distribuzione dell'epitopo AT100 nei neuroni piramidali della regione CA1 dell'ippocampo di individui con diverse età. Distribuzione di AT100 rispettivamente in cervelli giovani (20-40 anni) (A, D), adulti (40-60 anni) (B, E) e senili (più di 60 anni) (C, F, G), con evidente aumento a livello del senile. Nu: nucleolo. Barra della scala in A, B, C: 100 μ m; in D, E, F, G: 10 μ m. (H) Numero totale e relativo di cellule AT100 positive. (I) Quantificazione relativa dei segnali AT100 normalizzata rispetto al gruppo giovane. I dati sono espressi come RQ \pm SE di tre casi (giovani e adulti) o sei (senili) per gruppo. I gruppi di giovani e adulti sono sempre statisticamente diversi rispetto al senile (***) $P < 0,001$.

A livello dei neuroni granulari del DG, la distribuzione di AT100 risulta essere simile a quella dei neuroni piramidali della regione CA1. Su campioni sani giovani e senili risulta chiaramente visibile, con una maggiore quantità nei senili rispetto ai giovani (fig. 41), tuttavia, non raggiunge lo stesso livello osservato nei nuclei dei neuroni piramidali senili (fig. 40 e 41). Inoltre, sempre nei neuroni granulari senili, AT100 appare sotto forma di grandi blocchi molto evidenti alla periferia del nucleo, compartimento in gran parte corrispondente alla cromatina povera di GC. Nessun segnale invece, è stato rilevato nel citoplasma di queste cellule. Infine, a livello dei neuroni fetali i segnali di AT100 non sono rilevabili, o comunque rilevabili a bassissima quantità (fig. 41).

Questi risultati mostrano una evidente colocalizzazione di AT100 con l'eterocromatina nucleare e il suo progressivo aumento nel nucleo correlato all'età. Tuttavia, le quantità molto elevate osservate nei neuroni piramidali senili non sono altrettanto visibili nei neuroni granulari del giro dentato.

Pertanto, è possibile ipotizzare un possibile coinvolgimento della proteina tau, e in particolare dell'epitopo AT100, nell'organizzazione e/o protezione dell'eterocromatina durante la vita della cellula.

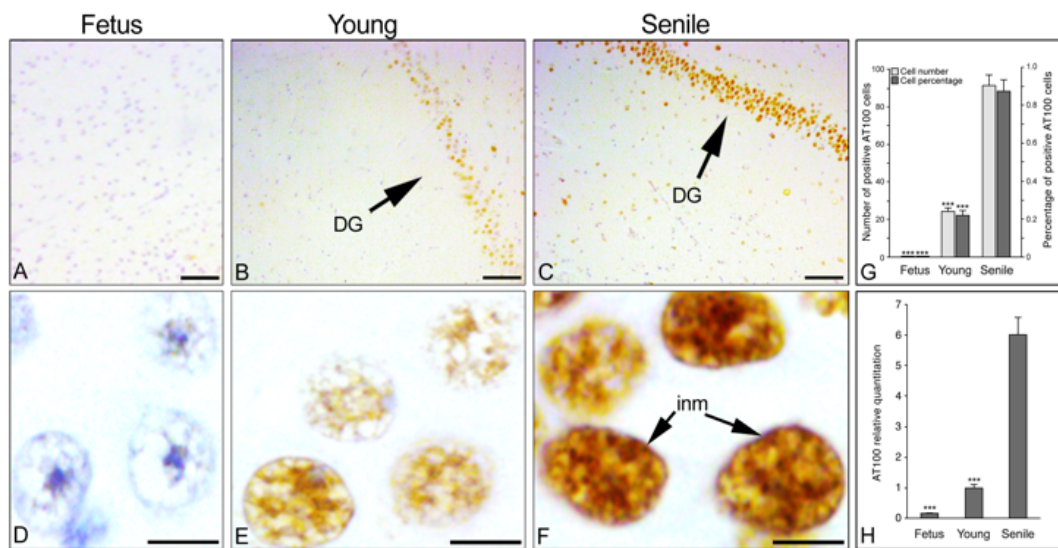


Figura 42. Analisi immunoistochimica della distribuzione dell'epitopo AT100 nei neuroni granulari del giro dentato (DG) di individui con diverse età. Distribuzione di AT100 in feto (8-12 settimane) (A, D), giovani (20-40 anni) (B, E) e senili (più di 60 anni) (C, F). Non vi è alcun segnale citoplasmatico di AT100 nelle cellule analizzate. DG: giro dentato; inm: membrana nucleare interna. Barra della scala in A, B, C: 100 μ m; in D, E, F: 10 μ m. (G) Numero totale e relativo di cellule AT100 positive. (H) Quantificazione relativa dei segnali di AT100 normalizzata rispetto al gruppo giovane. I dati sono espressi come RQ \pm SE di tre casi (feto e giovane) o sei (senile) per gruppo. Feto e gruppi giovani sono sempre statisticamente diversi rispetto al senile (***) P < 0,001).

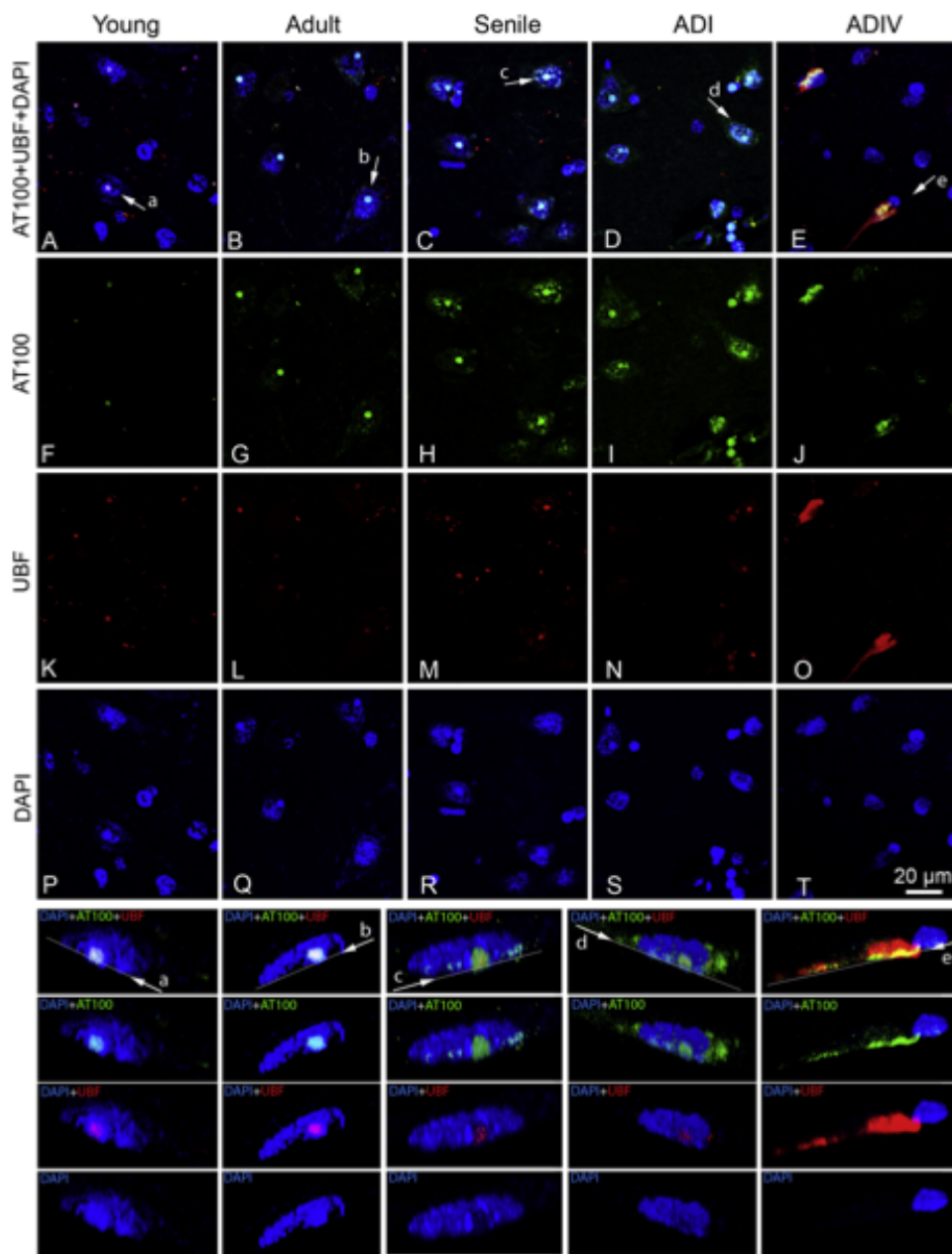


Figura 42. Co-localizzazione dell'epitopo AT100 con il marcatore nucleolare UBF nei neuroni piramidali della regione CA1 dell'ippocampo in individui con diverse età e stadio AD. Le immagini mostrano immunofluorescenze dual-color che rilevano la colocalizzazione (freccie bianche) a livello del nucleolo di AT100 (segnali verdi) e UBF (segnali rossi) nei neuroni piramidali rispettivamente di giovani (20-40 anni) (A), adulti (40-60 anni) (B), senili (oltre 60 anni) (C), ADI (D) e ADIV (E). In ADIV le freccie indicano due cellule affette con grovigli neurofibrillari (NFTs) e un nucleo degradato. Sempre in ADIV, è evidente la scomparsa di UBF dai nuclei e la sua localizzazione nel citoplasma, all'interno dei NFTs. Le immagini sono state ottenute con ingrandimento di 630x. A-E: segnali AT100 + UBF e colorazione DAPI (blu). F-J: segnali AT100 (segnali verdi). K-O: segnali UBF (segnali rossi). P-T: colorazione DAPI (blu). Barra della scala, mostrata nel pannello T: 20 µm.

Conclusioni

Il lavoro descritto nella presente tesi di dottorato ha messo in evidenza che alcune specifiche fosforilazioni fanno acquisire alla proteina tau delle proprietà ritenute rilevanti nell'invecchiamento neuronale e nell'inizio del percorso verso la morte cellulare specifica della malattia di Alzheimer.

I risultati ottenuti con l'epitopo AT100 (corrispondente alla proteina tau fosforilata nella regione Thr212/Ser214), che è stato analizzato in sezioni di tessuto di cervello umano a varie età (cervello fetale, di individui giovani, adulti, senile) e a vari stadi della malattia di Alzheimer (AD-I – AD-IV), hanno dimostrato il suo aumento nel nucleo, ed in modo particolare nel nucleolo, delle cellule nervose. Tale aumento è graduale dal cervello più giovane verso quello senile e ciò consente di ipotizzare che esso possa avere un ruolo di protezione della cromatina durante l'invecchiamento neuronale e che un'alterazione di tale funzione corrisponde ad un brusco decremento di AT100 che abbiamo rilevato durante il progredire della malattia di Alzheimer. Questo ci ha consentito di ipotizzare che tale epitopo possa essere considerato un marcatore molecolare dell'invecchiamento neuronale e che la sua scomparsa dal nucleo cellulare possa essere considerato un segno dell'insorgenza della malattia di Alzheimer.

Un altro epitopo che si è rivelato molto interessante è quello denominato AT8, che corrisponde alla proteina tau fosforilata nella regione Ser202/Thr205. Questa forma fosforilata di tau, dai risultati ottenuti con il presente lavoro di tesi, sembra essere molto importante nel passaggio della cellula dallo stato replicativo allo stato differenziato. Infatti, AT8 è assente nelle cellule di neuroblastoma replicative e compare nelle cellule differenziate, in particolare all'interno del nucleolo di tali cellule. Inoltre, AT8 compare anche in cellule replicative dopo esposizione con actinomicina-D, una molecola che blocca l'attività trascrizionale nel nucleolo. Questo indica che la presenza di AT8 è associata ad una ridotta attività trascrizionale del nucleolo. Lo stesso epitopo, nei neuroni della regione CA1 dell'ippocampo tende a scomparire in età avanzata. Infatti, AT8 aumenta nei neuroni fino all'età di 20-30 anni per poi diminuire nel cervello di età avanzata (65-68 anni) e nei primi stadi della malattia di Alzheimer. La sua scomparsa, in un numero rilevante di cellule nei neuroni di cervello senile e di Alzheimer, sembra indicare che tali cellule abbiano riacquisito, o si accingono a riacquistare, lo stato replicativo, come è stato chiaramente osservato *in vitro* con le cellule di neuroblastoma, in cui AT8 è assente nelle cellule

replicative. Trattandosi di cellule differenziate terminalmente, la ripresa del ciclo cellulare replicativo, presumibilmente non procede oltre e conduce alla morte dei neuroni.

La linea cellulare di neuroblastoma umano SK-N-BE, utilizzata per tale ricerca, si è rivelata un interessante modello di differenziamento cellulare *in vitro*, potendo avere a disposizione cellule replicative assimilabili ai neuroblasti e cellule differenziate assimilabili ai neuroni adulti a seguito del trattamento con acido retinoico. Nonostante la limitazione data dal rilevamento, nelle cellule replicative e differenziate, dell'isoforma più piccola ON3R definita fetale, rispetto alle isoforme adulte, questa linea cellulare ha permesso di identificare, in particolari forme fosforilate della proteina tau, come AT8, dei possibili marcatori molecolari di fasi precoci e di insorgenza della malattia di Alzheimer che sono state poi analizzate in modo più mirato nelle sezioni di tessuto cerebrale. Pertanto, la linea cellulare SK-N-BE potrebbe essere utilizzata come modello *in vitro* di degenerazione cellulare che rifletta quanto accade nei neuroni dei soggetti affetti dalla malattia di Alzheimer. Questo significherebbe poter avere la possibilità di saggiare *in vitro* l'efficacia di specifiche molecole bioattive che possano determinare il blocco della degenerazione neuronale indotta *in vitro*. Molecole che potranno poi essere saggiate *in vivo*.

La degenerazione cellulare e la proliferazione cellulare incontrollata rappresentano due diverse vie del destino cellulare specificamente legato alle malattie degenerative associate all'invecchiamento, rispettivamente come la malattia di Alzheimer e il cancro. Numerosi studi (Behrens et al., 2009; Ferrer, 2012; Navarrete-Reyes et al., 2016) hanno mostrato un'associazione inversa tra neurodegenerazione e cancro, in particolare i pazienti con la malattia di Alzheimer molto raramente hanno mostrato patologie tumorali e, al contrario, i pazienti con una storia di cancro hanno mostrato un rischio molto basso di avere la malattia di Alzheimer. Inoltre, altre evidenze (Cruickshanks and Adams, 2011; Driver 2014) indicano che la malattia di Alzheimer e il cancro sembrano essere correlati agli stessi meccanismi molecolari dell'invecchiamento e che la modifica della struttura della cromatina nucleare potrebbe influenzare entrambe le patologie. I risultati descritti nella presente tesi di dottorato vanno in questa direzione, avendo evidenziato che l'epitopo AT8, marcatore molecolare di inattività nucleolare, scompare nelle cellule senili, indicando una possibile ripresa dell'attività trascrizionale e presumibilmente un tentativo di riprendere il ciclo di divisione cellulare.

Bibliografia

- Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, 2001. *Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments*. Proc Natl Acad Sci U S A. **98** (12): 6923-8.
- Alonso AC, Mederlyova A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, 2004. *Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations*. J Biol Chem. **279** (33): 34873-81.
- Alonso AD, Cohen LS, Corbo C, Morozova V, Elldrissi A, Phillips G, Kleiman FE, 2018. *Hyperphosphorylation of Tau Associates With Changes in Its Function Beyond Microtubule Stability*. Front Cell Neurosci. **12**: 338.
- Alzheimer A, 1907. *Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin, **64**: 146-148.
- Andreadis A, 2005. *Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases*. Biochim Biophys Acta. **1739** (2-3): 91-103.
- Andreadis A, Brown WM, Kosik KS, 1992. *Structure and novel exons of the human tau gene*. Biochemistry. **31** (43): 10626-33.
- Andres D, Keyser BM, Petrali J, Benton B et al., 2013. *Morphological and functional differentiation in BE (2)-M17 human neuroblastoma cells by treatment with trans-retinoic acid*. BMC Neurosci. **14**: 49.
- Atwood CS, Bowen RL, 2015. *A Unified Hypothesis of Early- and Late-Onset Alzheimer's Disease Pathogenesis*. J Alzheimers Dis. **47** (1): 33-47.
- Avila J, 2009. *The Tau code*. Front. Aging Neurosci. **1**: 1.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F, 2004. *Role of tau protein in both physiological and pathological conditions*. Physiol Rev. **84** (2): 361-84.
- Bahadori M, Azizi MH, Dabiri S, 2018. *Recent Advances on Nucleolar Functions in Health and Disease*. Arch Iran Med. **21** (12): 600-607.
- Behrens MI, Lendon C, Roe CM, 2009. *A common biological mechanism in cancer and Alzheimer's disease?* Curr Alzheimer Res. **6**: 196-204.
- Bensaude O, 2011. *Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity?* Transcription. **2** (3): 103-108.
- Bersaglieri C, Santoro R, 2019. *Genome Organization in and around the Nucleolus*. Cells. **8**(6): E579
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS, 1978. *Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones*. Cancer Res. **38** (11): 3751-7.

- Biernat J, Mandelkow EM, 1999. *The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains.* Mol Biol Cell. **10** (3): 727-40.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI, 1985. *The distribution of tau in the mammalian central nervous system.* J Cell Biol. **101** (4): 1371-8.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI, 2007. *The multifunctional nucleolus.* Nat Rev Mol Cell Biol. **8** (7): 574-85.
- Bonda DJ, Bajić VP, Spremo-Potparevic B, Casadesus G, et al., 2010. *Review: cell cycle aberrations and neurodegeneration.* Neuropathol Appl Neurobiol. **36** (2): 157-63.
- Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K, 2006. *Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry.* Acta Neuropathol. **112** (4): 389-404.
- Braak H, Braak E, 1991. *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes.* Acta Neuropathol. **82** (4):239-59.
- Brady RM, Zinkowski RP, Binder LI, 1995. *Presence of tau in isolated nuclei from human brain.* Neurobiol Aging. **16** (3):479-86.
- Bryan JB, Nagle BW, Doenges KH, 1975. *Inhibition of tubulin assembly by RNA and other polyanions: evidence for a required protein.* Proc Natl Acad Sci U S A. **72** (9): 3570-4.
- Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR, 2000. *Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders.* Brain Res Brain Res Rev. **33** (1): 95-130.
- Bukar Maina M, Al-Hilaly YK, Serpell LC, 2016. *Nuclear Tau and Its Potential Role in Alzheimer's Disease.* Biomolecules. **6** (1): 9.
- Butner KA, Kirschner MW, 1991. *Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites.* J Cell Biol. **115** (3): 717-730.
- Caillet-Boudin ML, Buée L, Sergeant N, Lefebvre B, 2015. *Regulation of human MAPT gene expression.* Mol Neurodegener. **10**: 28.
- Camero S, Benítez MJ, Cuadros R, Hernández F, Avila J, Jiménez JS, 2014. *Thermodynamics of the interaction between Alzheimer's disease related tau protein and DNA.* PLoS One. **9** (8): e104690.
- Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I, 2000. *To be or not to be in the nucleolus.* Nat Cell Biol. **2** (6): E107-12.
- Carole AB, Angela M, Gronenborn A, Clore GM, 1998. *Minor groove-binding architectural proteins: Structure, function, and DNA recognition.* Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **27**: 105-131.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA, 2010. *Alzheimer disease.* Dis Mon. **56** (9):484-546.
- Chong FP, Ng KY, Koh RY, Chye SM, 2018. *Tau Proteins and Tauopathies in Alzheimer's Disease.* Cell Mol Neurobiol. **38** (5): 965-980.

- Chun W, Johnson GV, 2007. *The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death*. Front Biosci. 12: 733-56.
- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D et al., 2009. *Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain*. Nat Cell Biol. **11**(7): 909-13.
- Corces VG, Manso R, De La Torre J, Avila J, Nasr A, Wiche G, 1980. *Effects of DNA on microtubule assembly*. Eur J Biochem. **105** (1): 7-16
- Corces VG, Salas J, Salas ML, Avila J, 1978. *Binding of microtubule proteins to DNA: specificity of the interaction*. Eur J Biochem. **86** (2): 473-9.
- Cowan CM, Mudher A, 2013. *Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies?* Front Neurol. **4**: 114.
- Cremer T, Cremer M, 2010. *Chromosome territories*. Cold Spring Harb Perspect Biol. **2** (3): a003889.
- Crowther RA, Wischik CM, 1985. *Image reconstruction of the Alzheimer paired helical filament*. EMBO J. **4**: 3661–3665.
- Cruickshanks HA, Adams PD, 2011. *Chromatin: a molecular interface between cancer and aging*. Curr Opin Genet Dev. **21**: 100–106.
- Cubinkova V, Valachova B, Uhrinova I, Brezovakova V, Smolek T, Jadhav S, Zilka N, 2018. *Alternative hypotheses related to Alzheimer's disease*. Bratisl Lek Listy. **119** (4): 210-216.
- D'Alessio A, Vita GD, Cali G, Nitsch L et al., 1995. *Expression of the RET Oncogene Induces Differentiation of SK-N-BE Neuroblastoma Cells*. Cell Growth & Differentiation **6**: 1387-1394.
- Dauphinais C, 1981. *The control of ribosomal RNA transcription in lymphocytes evidence that the rate of chain elongation is the limiting factor*. Eur. J. Biochem. **114**: 487–492.
- de Calignon A, Polydoro M, Suárez-Calvet M, William C et al., 2012. *Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease*. Neuron. **73** (4): 685-97.
- Derisbourg M, Leghay C, Chiappetta G, Fernandez-Gomez FJ, et al., 2015. *Role of the Tau N-terminal region in microtubule stabilization revealed by new endogenous truncated forms*. Sci Rep. **5**: 9659.
- DeTure MA, Dickson DW, 2019. *The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease*. Mol Neurodegener. 14(1): 32.
- Diesch J, Hannan RD, Sanij E, 2014. *Perturbations at the ribosomal genes loci are at the centre of cellular dysfunction and human disease*. Cell Biosci. 4: 43.
- Ding Q, Markesbery WR, Chen Q, Li F, Keller JN, 2006. *Ribosome dysfunction is an early event in Alzheimer's disease*. J Neurosci. 2005 Oct 5;25(40):9171-5. Erratum in: J Neurosci. **26** (11): 3077.
- Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur EL, 2008. *Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau*. Science. **319** (5866): 1086-9.

- Driver JA, 2014. *Inverse association between cancer and neurodegenerative disease: review of the epidemiologic and biological evidence*. *Biogerontology*. **15**: 547-557.
- Fá M, Puzzo D, Piacentini R, Staniszewski A, et al., 2016. *Extracellular Tau Oligomers Produce An Immediate Impairment of LTP and Memory*. *Sci Rep*. **6**:19393.
- Federico C, Cantarella CD, Di Mare P, Tosi S, Saccone S, 2008. *The radial arrangement of the human chromosome 7 in the lymphocyte cell nucleus is associated with chromosomal band gene density*. *Chromosoma*. **117**: 399–410.
- Ferrer I, 2012. *Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia*. *Prog Neurobiol*. 2012; **97**: 38-51.
- Floutsakou I, Agrawal S, Nguyen TT, Seoighe C, Ganley AR, McStay B, 2013. *The shared genomic architecture of human nucleolar organizer regions*. *Genome Res*. **23** (12): 2003-12.
- Frost B, Hemberg M, Lewis J, Feany MB, 2014. *Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation*. *Nat Neurosci*. **17** (3): 357-66.
- Frost B, Jacks RL, Diamond MI, 2009. *Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell*. *J Biol Chem*. **284** (19): 12845-52.
- Funk KE, Thomas SN, Schafer KN, Cooper GL et al., 2014. *Lysine methylation is an endogenous post-translational modification of tau protein in human brain and a modulator of aggregation propensity*. *Biochem J*. **462** (1): 77-88.
- Furcila D, DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, 2018. *A Study of Amyloid- β and Phosphotau in Plaques and Neurons in the Hippocampus of Alzheimer's Disease Patients*. *J Alzheimers Dis*. **64** (2): 417-435.
- Gao YL, Wang N, Sun FR, Cao XP, Zhang W, Yu JT, 2018. *Tau in neurodegenerative disease*. *Ann Transl Med*. **6** (10): 175.
- Gärtner U, Janke C, Holzer M, Vanmechelen E, Arendt T, 1998. *Postmortem changes in the phosphorylation state of tau-protein in the rat brain*. *Neurobiol Aging*. **19** (6): 535-43.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA, 1989. *Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease*. *Neuron*. **3** (4): 519-26.
- Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, 1995. *Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain*. *J Neurochem*. **65** (2): 732-8.
- Goode BL, Chau M, Denis PE, Feinstein SC, 2000. *Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease*. *J Biol Chem*. **275** (49): 38182-9.
- Goodfellow SJ, Zomerdijk JC, 2013. *Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes*. *Subcell Biochem*. **61**: 211-36.
- Greenwood JA, Johnson GV, 1995. *Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau*. *Exp Cell Res*. **220** (2): 332-7.

- Grob A, McStay B, 2014. *Construction of synthetic nucleoli and what it tells us about propagation of sub-nuclear domains through cell division*. Cell Cycle. **13** (16): 2501-8.
- Grummt I, 2007. *Different epigenetic layers engage in complex crosstalk to define the epigenetic state of mammalian rRNA genes*. Hum Mol Genet. **16**: R21-7.
- Grummt I, 2013. *The nucleolus-guardian of cellular homeostasis and genome integrity*. Chromosoma **122**: 487–497
- Grummt I, Pikaard CS, 2003. *Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription*. Nat Rev Mol Cell Biol. **4** (8): 641-9.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI, 1986. *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology*. Proc Natl Acad Sci U S A. **83** (13): 4913-7.
- Guettg C, Lienemann P, Sirri V, Grummt I et al., 2010. *The NoRC complex mediates the heterochromatin formation and stability of silent rRNA genes and centromeric repeats*. EMBO J. **29** (13): 2135-46.
- Guo T, Noble W, Hanger DP, 2017. *Roles of tau protein in health and disease*. Acta Neuropathol. **133** (5): 665-704.
- Hardy J, Selkoe DJ, 2002. *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. Science. **297** (5580): 353-6.
- He HJ, Wang XS, Pan R, Wang DL, Liu MN, He RQ, 2009. *The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin*. BMC Cell Biol. **10**: 81.
- Henderson AS, Warburton D, Atwood KC, 1972. *Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement*. Proc Natl Acad Sci U S A. **69** (11): 3394-8.
- Herdman C, Mars JC, Stefanovsky VY, Tremblay MG et al., 2017. *A unique enhancer boundary complex on the mouse ribosomal RNA genes persists after loss of Rrn3 or UBF and the inactivation of RNA polymerase I transcription*. PLoS Genet. **13** (7): e1006899.
- Hernández-Ortega K, Garcia-Esparcia P, Gil L, Lucas JJ, Ferrer I, 2015. *Altered machinery of protein synthesis in Alzheimer's: from the nucleolus to the ribosome*. Brain Pathol. **26**: 593–605.
- Hernandez-Verdun D, 2011. *Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle*. Nucleus. **2**: 189-94.
- Hu Y, Li XC, Wang ZH, Luo Y et al., 2016. *Tau accumulation impairs mitophagy via increasing mitochondrial membrane potential and reducing mitochondrial Parkin*. Oncotarget. **7** (14): 17356-68.
- Hua Q, He RQ, 2002. *Effect of phosphorylation and aggregation on tau binding to DNA*. Protein Pept Lett. **9** (4): 349-57.
- Hua Q, He RQ, Haque N, Qu MH, del Carmen Alonso A, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, 2003. *Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA*. Cell Mol Life Sci. **60** (2): 413-21.

- Hyman BT, Augustinack JC, Ingelsson M, 2005. *Transcriptional and conformational changes of the tau molecule in Alzheimer's disease*. *Biochim Biophys Acta*. **1739** (2-3): 150-7.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, 2015. *Tau and neurodegenerative disease: the story so far*. *Nat Rev Neurol*. **12** (1): 15-27.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso AC, Grundke-Iqbal I, 2009. *Mechanisms of tau-induced neurodegeneration*. *Acta Neuropathol*. **118** (1): 53-69.
- Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M et al., 2010. *Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models*. *Cell*. **142** (3): 387-97.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Götz, J, 2009. *Phosphorylated tau interacts with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1 (JIP1) in Alzheimer disease*. *J. Biol. Chem*. **284**: 20909–20916, 2009.
- Jämsä A, Hasslund K, Cowburn RF, Bäckström A, Vasänge M, 2004. *The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation*. *Biochem Biophys Res Commun*. **319** (3): 993-1000.
- Jeganathan S, Hascher A, Chinnathambi S, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E, 2008. *Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation*. *J. Biol. Chem*. **283**: 32066–32076.
- Johnson KA, Schultz A, Betensky RA, Becker JA et al., 2015. *Tau PET imaging in aging and early Alzheimer's disease*. *Ann. Neurol*. **79**: 110-119.
- Kametani F, Hasegawa M, 2018. *Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease*. *Front Neurosci*. **12**: 25.
- Kampers T, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E, 1996. *RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments*. *FEBS Lett*. **399** (3): 344-9.
- Kanemaru K, Takio K, Miura R, Titani K, Ihara Y, 1992. *Fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments*. *J Neurochem*. **58** (5): 1667-75.
- Kellogg EH, Hejab NMA, Poepsel S, Downing, KH, DiMaio F, Nogales E, 2018. *Near-atomic model of microtubule-tau interactions*. *Science*. **360**: 1242–1246.
- Khan UA, Liu L, Provenzano FA, Berman DE, et al., 2014. *Molecular drivers and cortical spread of lateral entorhinal cortex dysfunction in preclinical Alzheimer's disease*. *Nat. Neurosci*. **17**: 304-311.
- Kidd, M, 1963. *Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease*. *Nature*. **197**: 192-193.
- Kim J, Chakrabarty P, Hanna A, March A et al., 2013. *Normal cognition in transgenic BRI2-A β mice*. *Mol. Neurodegener*. **8**: 15.
- Kohara K, Pignatelli M, Rivest AJ, Jung HY et al., 2014. *Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits*. *Nat. Neurosci*. **17**: 269-279.
- Kolarova M, García-Sierra F, Bartos A, Ricny J, Ripova D, 2012. *Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease*. *Int J Alzheimers Dis*. **2012**: 731526.

- Köpke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, 1993. *Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease.* J Biol Chem. **268** (32): 24374-84.
- Kozlov S, Afonin A, Evsyukov I, Bondarenko A, 2017. *Alzheimer's disease: as it was in the beginning.* Rev Neurosci. **28** (8): 825-843.
- Krylova SM, Musheev M, Nutiu R, Li Y, Lee G, Krylov SN, 2005. *Tau protein binds single-stranded DNA sequence specifically-the proof obtained in vitro with non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures.* FEBS Lett. **579** (6): 1371-5.
- Lane CA, Hardy J, Schott JM, 2018. *Alzheimer's disease.* Eur J Neurol. **25** (1): 59-70.
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Sarmiento J et al., 2012. *Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease.* FASEB J. **26** (5): 1946-59.
- Lavenex P, Banta Lavenex P, 2013. *Building hippocampal circuits to learn and remember: insights into the development of human memory.* Behav Brain Res. **254**: 8-21.
- Latonen L, 2019. *Phase-to-Phase With Nucleoli - Stress Responses, Protein Aggregation and Novel Roles of RNA.* Front Cell Neurosci. **13**: 151.
- Leotta CG, Federico C, Brundo MV, Tosi S, Saccone S, 2014. *HLXB9 gene expression, and nuclear location during in vitro neuronal differentiation in the SK-N-BE neuroblastoma cell line.* PLoS One. **9**: e105481.
- Lewis J, Dickson DW, 2016. *Propagation of tau pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies.* Acta Neuropathol. **131** (1): 27-48.
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H et al., 2000. *Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein.* Nat Genet. **25** (4): 402-5.
- Liu C, Götz J, 2013. *Profiling murine tau with ON, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus.* PLoS One. **8** (12): e84849.
- Liu C, Song X, Nisbet R, Götz J, 2016. *Co-immunoprecipitation with Tau Isoform-specific Antibodies Reveals Distinct Protein Interactions and Highlights a Putative Role for 2N Tau in Disease.* J Biol Chem. **291** (15): 8173-88.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX, 2005. *Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation.* Eur J Neurosci. **22** (8): 1942-50.
- Liu L, Drouet V, Wu JW, Witter MP, Small SA, Clelland C, Duff K, 2012. *Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo.* PLoS One. **7** (2): e31302.
- Llorens-Martín M, Blazquez-Llorca L, Benavides-Piccione R, Rabano A et al., 2014. *Selective alterations of neurons and circuits related to early memory loss in Alzheimer's disease.* Front Neuroanat. **8**: 38.

- Llorens-Martin M, Fuster-Matanzo A, Teixeira CM, Jurado-Arjona J et al., 2013. *GSK-3beta overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons in vivo*. Mol. Psychiatry **18**: 451-460.
- Loomis PA, Howard TH, Castleberry RP, Binder LI, 1990. *Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. **87** (21): 8422-6.
- Lu J, Li T, He R, Bartlett PF, Götz J, 2014b. *Visualizing the microtubule-associated protein tau in the nucleus*. Sci China Life Sci. **57** (4): 422-31.
- Lu J, Miao J, Su T, Liu Y, He R, 2013. *Formaldehyde induces hyperphosphorylation and polymerization of Tau protein both in vitro and in vivo*. Biochim Biophys Acta. **1830** (8): 4102-16.
- Lu SS, Gong FF, Feng F, Hu CY, Qian ZZ, Wu YL, Yang HY, Sun YH, 2014a. *Association of microtubule associated protein tau/Saitohin (MAPT/STH) MAPT_238bp/STH Q7R polymorphisms and Parkinson's disease: A meta-analysis*. Biochem Biophys Res Commun. **453** (3): 653-61.
- Luna-Muñoz J, Chávez-Macías L, García-Sierra F, Mena R, 2007. *Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis. 2007 **12** (4): 365-75.
- Luo HB, Xia YY, Shu XJ, Liu ZC et al., 2014. *SUMOylation at K340 inhibits tau degradation through deregulating its phosphorylation and ubiquitination*. Proc Natl Acad Sci U S A. **111** (46): 16586-91.
- Luo MH, Leski ML, Andreadis A, 2004a. *Tau isoforms which contain the domain encoded by exon 6 and their role in neurite elongation*. J Cell Biochem. **91** (5): 880-95.
- Luo MH, Tse SW, Memmott J, Andreadis A, 2004b. *Novel isoforms of tau that lack the microtubule-binding domain*. J Neurochem. **90** (2): 340-51.
- Mandelkow EM, Mandelkow E, 2012. *Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration*. Cold Spring Harb Perspect Med. **2** (7): a006247.
- Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, 2003. *Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses*. Neurobiol Aging. **24** (8):1079-85.
- Mangan H, Gailín MÓ, McStay B, 2017. *Integrating the genomic architecture of human nucleolar organizer regions with the biophysical properties of nucleoli*. FEBS J. **284** (23): 3977-3985.
- Mansuroglu Z, Benhelli-Mokrani H, Marcato V, Sultan A et al., 2016. *Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin*. Sci Rep. **6**: 33047.
- Martin L, Latypova X, Terro F, 2011. *Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease*. Neurochem Int. **58** (4): 458-71.
- Mayer C, Schmitz KM, Li J, Grummt I, Santoro R, 2006. *Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes*. Mol Cell. **22** (3): 351-61.
- McCarthy A, Lonergan R, Olszewska DA, O'Dowd S et al., 2015. *Closing the tau loop: the missing tau mutation*. Brain. **138** (10): 3100-9.
- McKeown PC, Shaw PJ, 2009. *Chromatin: linking structure and function in the nucleolus*. Chromosoma. **118** (1): 11-23.

- McShea A, Harris PL, Webster KR, Wahl AF, Smith MA, 1997. *Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease*. Am J Pathol. **150** (6):1933-9.
- McStay B, 2016. *Nucleolar organizer regions: genomic 'dark matter' requiring illumination*. Genes Dev. **30** (14): 1598-610
- McStay B, Grummt I, 2008. *The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology*. Annu Rev Cell Dev Biol. **24**: 131-57.
- Meraz-Ríos MA, Lira-De León KI, Campos-Peña V, De Anda-Hernández MA, Mena-López R, 2010. *Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease*. J Neurochem. **112**(6): 1353-67.
- Merino-Serrais P, Benavides-Piccione R, Blazquez-Llorca L, Kastanauskaite A et al., 2013. *The influence of phospho-tau on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer's disease*. Brain. **136**: 1913-1928.
- Metuzals J, Robitaille Y, Houghton S, Gauthier S, Leblanc R, 1988. *Paired helical filaments and the cytoplasmic nuclear interface in Alzheimer's disease*. J Neurocytol. **17** (6): 827-33.
- Mi K, Johnson GV, 2006. *The role of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Curr Alzheimer Res. **3** (5): 449-63.
- Moh C, Kubiak JZ, Bajic VP, Zhu X, Smith MA, Lee HG, 2011. *Cell cycle deregulation in the neurons of Alzheimer's disease*. Results Probl Cell Differ. **53**: 565-76.
- Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Zhu X, Moreira PI et al., 2013. *Phosphorylation of tau protein as the link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and connectivity failure: implications for Alzheimer's disease*. Oxid Med Cell Longev. **2013**: 940603.
- Moreira PI, Santos MS, Oliveira CR, Shenk JC et al., 2008. *Alzheimer disease and the role of free radicals in the pathogenesis of the disease*. CNS Neurol Disord Drug Targets. **7**: 3-10.
- Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L, 2011. *The many faces of tau*. Neuron. **70** (3): 410-26.
- Moss T, Mars JC, Tremblay MG, Sabourin-Felix M, 2019. *The chromatin landscape of the ribosomal RNA genes in mouse and human*. Chromosome Res. **27** (1-2): 31-40.
- Moss, Langlois, Gagnon-Kugler, Stefanovsky, 2007. *A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis*. Cell. Mol. Life Sci. **64**: 29-49.
- Mudher A, Colin M, Dujardin S, Medina M et al., 2017. *What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation?* Acta Neuropathol Commun. **5** (1): 99.
- Mufson EJ, Mahady L, Waters D, Counts SE et al., 2015. *Hippocampal plasticity during the progression of Alzheimer's disease*. Neuroscience. **309**: 51-67.
- Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J, Jeganathan S et al., 2009. *Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution*. PLoS Biol. **7** (2): e34.
- Naseri NN, Wang H, Guo J, Sharma M, Luo W, 2019. *The complexity of tau in Alzheimer's disease*. Neurosci Lett. **705**: 183-194.

- Navarrete-Reyes AP, Soto-Pérez de Celis E, Hurria A, 2016. *Cancer and Aging: a complex biological association*. Rev Invest Clin. 2016; **68**:17-24.
- Németh A, Grummt I, 2018. *Dynamic regulation of nucleolar architecture*. Curr Opin Cell Biol. **52**: 105-111.
- Nemeth A, Guibert S, Tiwari VK, Ohlsson R, Langst G, 2008. *Epigenetic regulation of TTF-I-mediated promoter-terminator interactions of rRNA genes*. EMBO J. **27**: 1255-1265.
- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA, 1986. *Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2*. Brain Res. **387** (3): 271-80.
- Noble W, Hanger DP, Miller CC, Lovestone S, 2013. *The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases*. Front Neurol. **4**: 83.
- Nuebler J, Fudenberg G, Imakaev M, Abdennur N, Mirny LA, 2018. *Chromatin organization by an interplay of loop extrusion and compartmental segregation*. Proc Natl Acad Sci U S A. **115** (29): E6697-E6706.
- O'Sullivan AC, Sullivan GJ, McStay B, 2002. *UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat*. Mol Cell Biol. **22** (2): 657-68.
- Oliveira VC, Carrara RC, Simoes DL, Saggiaro FP, Carlotti Jr CG, Covas DT, Neder L, 2010. *Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of in situ hybridization specific fluorescent signals of brain sections*. Histol. Histopathol. **258**: 1017–1024.
- Pallas-Bazarra N, Jurado-Arjona J, Navarrete M, Esteban JA et al., 2016. *Novel function of Tau in regulating the effects of external stimuli on adult hippocampal neurogenesis*. The EMBO Journal. **35** (13): 1417–1436.
- Papasozomenos SC, 1997. *The heat shock-induced hyperphosphorylation of tau is estrogen-independent and prevented by androgens: implications for Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A. **94** (13): 6612-7.
- Papasozomenos SC, Su Y, 1991. *Altered phosphorylation of tau protein in heat-shocked rats and patients with Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A. **88** (10): 4543-7.
- Park SA, Ahn SI, Gallo JM, 2016. *Tau mis-splicing in the pathogenesis of neurodegenerative disorders*. BMB Rep. **49** (8): 405-13.
- Parlato R, Kreiner G, 2013. *Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle?* J Mol Med (Berl). **91** (5): 541-7.
- Pederson T, 2011. *The nucleolus*. Cold Spring Harb Perspect Biol. **3** (3).
- Pegoraro G, Misteli T, 2009. *The central role of chromatin maintenance in aging*. Aging (Albany NY). **1**(12): 1017-22.
- Perry RP, Kelley DE, 1970. *Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species*. J Cell Physiol. **76** (2): 127-39.

- Pickard AJ, Bierbach U, 2013. *The cell's nucleolus: an emerging target for chemotherapeutic intervention*. ChemMedChem. **8** (9): 1441-9.
- Pietrzak M, Rempala G, Nelson PT, Zheng JJ, Hetman M, 2011. *Epigenetic silencing of nucleolar rRNA genes in Alzheimer's disease*. PLoS One. **6** (7): e22585. Central PMCID: PMC3142181.
- Pooler AM, Noble W, Hanger DP, 2014. *A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis*. Neuropharmacology. **76**: 1-8.
- Pooler AM, Usardi A, Evans CJ, Philpott KL, Noble W, Hanger DP, 2012. *Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation*. Neurobiol Aging. **33** (2): 431.e27-38.
- Potapova TA, Gerton JL, 2019. *Ribosomal DNA and the nucleolus in the context of genome organization*. Chromosome Res. **27**(1-2): 109-127.
- Qi H, Cantrelle FX, Benhelli-Mokrani H, Smet-Nocca C et al., 2015. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization of interaction of Tau with DNA and its regulation by phosphorylation*. Biochemistry. **54** (7): 1525-33.
- Qu MH, Li H, Tian R, Nie CL, Liu Y, Han BS, He RQ, 2004. *Neuronal tau induces DNA conformational changes observed by atomic force microscopy*. Neuroreport. **15** (18): 2723-7.
- Raina AK, Zhu X, Rottkamp CA, Monteiro M, Takeda A, Smith MA, 2000. *Cyclin' toward dementia: cell cycle abnormalities and abortive oncogenesis in Alzheimer disease*. J Neurosci Res. **61** (2): 128-33.
- Rape M, 2017. *Ubiquitylation at the crossroads of development and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol. **19** (1): 59-70.
- Reynolds MR, Berry RW, Binder LI, 2005. *Site-specific nitration differentially influences tau assembly in vitro*. Biochemistry. **44** (42): 13997-4009.
- Rossi G, Dalprà L, Crosti F, Lissoni S, Sciacca FL, Catania M, Di Fede G, Mangieri M, Giaccone G, Croci D, Tagliavini F, 2008. *A new function of microtubule-associated protein Tau: involvement in chromosome stability*. Cell Cycle. **7**: 1788–1794.
- Saccone S, Federico C, Bernardi G, 2002. *Localization of the gene-richest and the gene-poorest isochores in the interphase nuclei of mammals and birds*. Gene. **300** (1-2): 169-78.
- Sanij E, Hannan RD, 2009. *The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin*. Epigenetics. **4** (6): 374-82.
- Santoro R, Schmitz KM, Sandoval J, Grummt I, 2010. *Intergenic transcripts originating from a subclass of ribosomal DNA repeats silence ribosomal RNA genes in trans*. EMBO Rep. **11** (1): 52-8.
- Schöfer C, Weipoltshammer K, 2018. *Nucleolus and chromatin*. Histochem Cell Biol. **150**(3): 209-225.
- Sengupta A, Kabat J, Novak M, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, 1998. *Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules*. Arch Biochem Biophys. **357** (2): 299-309.

- Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin ML et al., 2008. *Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders*. Expert Rev Proteomics. **5** (2): 207-24.
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT, 2011. *Neuropathological alterations in Alzheimer disease*. Cold Spring Harb Perspect Med. **1** (1): a006189.
- Shahani N, Brandt R, 2002. *Functions and malfunctions of the tau proteins*. Cell Mol Life Sci. **59** (10): 1668-80.
- Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington C et al., 2016. *Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies*. Biomolecules. **6** (1): 6.
- Sjöberg MK, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E, 2006. *Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization*. J Cell Sci. **119** (Pt 10): 2025-34.
- Smith CJ, Anderton BH, Davis DR, Gallo JM, 1995. *Tau isoform expression and phosphorylation state during differentiation of cultured neuronal cells*. FEBS Lett. **375**: 243–248.
- Sohn PD, Tracy TE, Son HI, Zhou Y et al., 2016. *Acetylated tau destabilizes the cytoskeleton in the axon initial segment and is mislocalized to the somatodendritic compartment*. Mol Neurodegener. **11** (1): 47.
- Souter S, Lee G, 2009. *Microtubule-associated protein Tau in human prostate cancer cells: isoforms, phosphorylation and interactions*. J. Cell. Biochem. **108**: 555–564.
- Strang KH, Golde TE, Giasson BI, 2019. *MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration*. Lab Invest. **99** (7): 912-928.
- Sultan A, Nessler F, Violet M, Bégard S et al., 2011. *Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection*. J Biol Chem. **286** (6): 4566-75.
- Szendrei GI, Lee VM, Otvos L Jr, 1993. *Recognition of the minimal epitope of monoclonal antibody Tau-1 depends upon the presence of a phosphate group but not its location*. J Neurosci Res. **34** (2): 243-9.
- Takada H, Kurisaki A, 2015. *Emerging roles of nucleolar and ribosomal proteins in cancer, development, and aging*. Cell Mol Life Sci. **72** (21): 4015-25.
- Takeda S, 2019. *Progression of Alzheimer's disease, tau propagation, and its modifiable risk factors*. Neurosci Res. **141**: 36-42.
- Takeda S, Wegmann S, Cho H, DeVos SL et al., 2015. *Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer's disease brain*. Nat Commun. **6**: 8490.
- Tapia-Rojas C, Cabezas-Opazo F, Deaton CA, Vergara EH et al., 2019. *It's all about tau*. Prog Neurobiol. **175**: 54-76.

- Tchelidze P, Benassarou A, Kaplan H, O'Donohue MF et al., 2017. *Nucleolar sub-compartments in motion during rRNA synthesis inhibition: Contraction of nucleolar condensed chromatin and gathering of fibrillar centers are concomitant*. PLoS One. **12** (11): e0187977.
- Tenreiro S, Eckermann K, Outeiro TF, 2014. *Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe?* Front Mol Neurosci. **7**: 42.
- Terry RD 1963. *The fine structure of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. **22**: 629–642.
- Thurston VC, Pena P, Pestell R, Binder LI, 1997. *Nucleolar localization of the microtubule-associated protein tau in neuroblastomas using sense and anti-sense transfection strategies*. Cell Motil Cytoskeleton. **38** (1): 100-10.
- Thurston VC, Zinkowski RP, Binder LI, 1996. *Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo*. Chromosoma. **105** (1): 20-30.
- Toni N, Sultan S, 2011. *Synapse formation on adult-born hippocampal neurons*. Eur. J. Neurosci. **33**: 1062-1068.
- Torelli UL, Henry PH, Weissman SM, 1968. *Characteristics of the RNA synthesized in vitro by the normal human small lymphocyte and the changes induced by phytohemagglutinin stimulation*. J. Clin. Invest. **47**: 1083–1095.
- Ueshima S, Nagata K, Okuwaki M, 2017. *Internal Associations of the Acidic Region of Upstream Binding Factor Control Its Nucleolar Localization*. Mol Cell Biol. **37** (22): e00218-17.
- van Sluis M, McStay B, 2017. *Nucleolar reorganization in response to rDNA damage*. Curr Opin Cell Biol. **46**: 81-86.
- Venkatramani A, Panda D, 2019. *Regulation of neuronal microtubule dynamics by tau: Implications for tauopathies*. Int J Biol Macromol. **133**: 473-483.
- Vincent I, Zheng JH, Dickson DW, Kress Y, Davies P, 1998. *Mitotic phosphoepitopes precede paired helical filaments in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging. **19** (4): 287-96.
- Vincent WS, 1952. *The Isolation and Chemical Properties of the Nucleoli of Starfish Oocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A. **38** (2): 139-45.
- Violet M, Delattre L, Tardivel M, Sultan A et al., 2014. *A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions*. Front Cell Neurosci. **8**: 84.
- von Bergen M, Barghorn S, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E, 2005. *Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure*. Biochim Biophys Acta. **1739** (2-3):158-66.
- von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E, 2000. *Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (306VQIVYK311) forming beta structure*. Proceedings of the National Academy of Sciences. **97** (10): 5129–5134.

- Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, 2012. *Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration*. J Alzheimers Dis. **33**: S123-39.
- Wang Y, Loomis PA, Zinkowski RP, Binder LI, 1993. *A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau*. J Cell Biol. **121** (2): 257-67.
- Wang Y, Mandelkow E, 2016. *Tau in physiology and pathology*. Nat Rev Neurosci. **17** (1): 5-21.
- Wang X, Wang D, Zhao J, Qu M, Zhou X, He H, He R, 2006. *The proline-rich domain and the microtubule binding domain of protein Tau acting as RNA binding domains*. Protein Pept. Lett. **13**: 679–685.
- Warmerdam DO, van den Berg J, Medema RH, 2016. *Breaks in the 45S rDNA Lead to Recombination-Mediated Loss of Repeats*. Cell Rep. **14** (11): 2519-27.
- Wei Y, Qu MH, Wang XS, Chen L, Wang DL, Liu Y, Hua Q, He RQ, 2008. *Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation*. PLoS One. **3** (7): e2600.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo S, Kirschner MW, 1975. *A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **72** (5): 1858-1862.
- Wischik CM, Crowther RA, Stewart M, Roth M, 1985. *Subunit structure of paired helical filaments in Alzheimer's disease*. J. Cell Biol. **100**: 1905–1912.
- Wu XL, Piña-Crespo J, Zhang YW, Chen XC, Xu HX, 2017. *Tau-mediated Neurodegeneration and Potential Implications in Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease*. Chin Med J (Engl). **130** (24): 2978-2990.
- Yang X, Yao C, Tian T, Li X, et al., 2018. *A novel mechanism of memory loss in Alzheimer's disease mice via the degeneration of entorhinal-CA1 synapses*. Mol Psychiatry. **23**: 199-210.
- Yang Y, Geldmacher DS, Herrup K, 2001. *DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease*. J. Neurosci. **21**: 2661-2668.
- Zabik NL, Imhof MM, Martic-Milne S, 2017. *Structural evaluations of tau protein conformation: methodologies and approaches*. Biochem Cell Biol. **95** (3): 338-349.
- Zempel H, Dennissen FJA, Kumar Y, Luedtke J et al., 2017. *Axodendritic sorting and pathological missorting of Tau are isoform-specific and determined by axon initial segment architecture*. J Biol Chem. **292** (29): 12192-12207.
- Zhou Y, Shi J, Chu D, Hu W, et al., 2018. *Relevance of Phosphorylation and Truncation of Tau to the Etiopathogenesis of Alzheimer's Disease*. Front Aging Neurosci. **10**: 27.
- Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA, 2007. *Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update*. Biochim Biophys Acta. **1772** (4): 494-502.
- Zvěřová M, 2019. *Clinical aspects of Alzheimer's disease*. Clin Biochem. **S0009-9120** (19): 30132-8.

